



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118109416 A

(43) 申请公布日 2024.05.31

(21) 申请号 202310329934.9

C12N 15/113 (2010.01)

(22) 申请日 2023.03.30

A61K 39/00 (2006.01)

(71) 申请人 广州百吉生物制药有限公司

A61K 38/20 (2006.01)

地址 510555 广东省广州市黄埔区中新广
州知识城腾飞一街2号318-321房

A61K 31/7088 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(72) 发明人 张曦 黄智宏 燕妮 陈少沛
朱晓娜 韩德平

(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限
公司 31266

专利代理师 徐迅 崔佳佳

(51) Int. Cl.

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/867 (2006.01)

C12N 15/24 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

权利要求书2页 说明书27页

序列表(电子公布) 附图9页

(54) 发明名称

功能增强型工程化免疫细胞及其制备和应用

(57) 摘要

本发明提供了功能增强型工程化免疫细胞及其制备和应用。本发明通过同时上调IL-7通路和抑制TGF β 通路,显著提高了工程化免疫细胞的IL-7信号的激活程度和对肿瘤微环境的抵抗能力,同时降低IL-7过量表达而造成的毒副作用。本发明的工程化免疫细胞尤其是TIL,可用于治疗实体瘤。

1. 一种工程化免疫细胞,其特征在于,所述工程化免疫细胞为T细胞、TIL细胞、或NK细胞,并且所述的免疫细胞具有以下特征:

(a) 所述的免疫细胞表达外源的IL-7蛋白;和

(b) 所述的免疫细胞表达外源的TGFβRII显性抑制突变体蛋白或靶向内源TGFβRII转录本的shRNA。

2. 如权利要求1所述的工程化免疫细胞,其特征在于,所述免疫细胞表达嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR),其中所述CAR靶向肿瘤细胞的表面标志物。

3. 如权利要求1所述的工程化免疫细胞,其特征在于,所述的IL-7蛋白的结构如式Z如下:

A-H-TM-D(Z)

式中,

A为IL-7蛋白,或其活性片段,或其突变体;

H为无或铰链区;

TM为无或跨膜结构域;

D为无或降解结构域(包括野生型、或其突变体/修饰体);所述“-”为连接肽或肽键。

4. 如权利要求1所述的工程化免疫细胞,其特征在于,所述的IL-7蛋白和TGFβRII显性抑制突变体的结构如式I所示:

Z0-Z1-Z2-D(I)

式中,

Z0和Z2中的一个为IL-7蛋白,另一个为TGFβRII显性抑制突变体;

Z1为无、或连接肽;

D为无或降解结构域(包括野生型、或其突变体/修饰体);

所述“-”为无、连接肽或肽键。

5. 如权利要求2所述的工程化免疫细胞,其特征在于,所述CAR的结构如式II所示:

L-scFv1-H-TM-C-CD3ζ-D(II)

式中,

L为无或信号肽序列;

scFv1为靶向肿瘤细胞的表面标志物的抗原结合结构域(如抗体或其活性片段);

H为无或铰链区;

TM为跨膜结构域;

C为共刺激信号结构域;

CD3ζ为源于CD3ζ的胞浆信号传导序列(包括野生型、或其突变体/修饰体);

D为无或降解结构域(包括野生型、或其突变体/修饰体);

所述“-”为连接肽或肽键。

6. 如权利要求5所述的工程化免疫细胞,其特征在于,除了式II所示的第一CAR之外,所述CAR-T细胞还含有用于针对第二抗原的第二CAR,所述的第二CAR的结构如式III所示:

L-scFv2-H-TM-C-CD3ζ-D(III)

式中,

L为无或信号肽序列;

scFv2为靶向第二肿瘤细胞的表面标志物的抗原结合结构域(如抗体或其活性片段);
H为无或铰链区;
TM为跨膜结构域;
C为共刺激结构域;
CD3 ζ 为源于CD3 ζ 的胞浆信号传导序列或其突变/修饰体;
D为无或降解结构域(包括野生型、或其突变体/修饰体);
所述“-”为连接肽或肽键。

7. 一种制备如权利要求1所述的工程化免疫细胞的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(A) 提供一待改造的免疫细胞;和

(B) 对所述的免疫细胞进行改造,从而使得所述的免疫细胞表达外源的IL-7蛋白和外源的TGF β R11显性抑制突变体蛋白或靶向内源TGF β R11转录本的shRNA,从而获得权利要求1所述的工程化免疫细胞。

8. 一种制剂,其特征在于,所述制剂含有如权利要求1所述的工程化免疫细胞,以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

9. 一种如权利要求1所述的工程化免疫细胞的用途,其特征在于,用于制备预防和/或治疗癌症的药物或制剂。

10. 一种用于制备如权利要求1所述的工程化免疫细胞的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒含有容器,以及位于容器内的:

(1) 第一核酸序列,所述第一核酸序列含有用于表达IL-7的第一表达盒;和

(2) 第二核酸序列,所述第二核酸序列含有用于表达TGF β R11显性抑制突变体或靶向内源TGF β R11转录本的shRNA的第二表达盒。

功能增强型工程化免疫细胞及其制备和应用

技术领域

[0001] 本发明属于肿瘤免疫和细胞治疗领域,具体地,涉及功能增强型工程化免疫细胞及其制备和应用。

背景技术

[0002] T细胞是参与细胞免疫的一类重要的淋巴细胞,通过抗原呈递细胞的辅助,可以特异性地识别并杀伤肿瘤细胞。然而,肿瘤细胞也会通过减少或丢失抗原表位、构建免疫抑制微环境、进化出不同异质性的肿瘤(即同一种恶性肿瘤在不同患者个体间或者同一患者体内不同部位肿瘤细胞间,从基因型到表型上存在的差异)等方式阻碍T细胞的特异性识别,从而逃避机体的免疫应答。

[0003] 嵌合抗原受体T细胞(chimeric antigen receptor T cell,CAR-T)疗法正是针对该问题应运而生的。具体来说,CAR分子是一种人为设计和构建的受体分子,由信号肽、胞外抗原结合域、铰链区、跨膜区、共刺激结构域、胞内信号传导结构域等部分组成,具有特异性识别肿瘤表面抗原、激活T细胞杀伤活性和刺激T细胞增殖等功能。通过采集肿瘤患者的T细胞并以人工方法转导CAR分子的基因,使患者自体的T细胞表达CAR分子,获得CAR-T细胞。回输至患者体内后,CAR-T细胞可以通过CAR分子特异性且高效的识别并杀伤肿瘤细胞,达到癌症治疗的效果。

[0004] CAR-T疗法的概念从1989年首次提出以来,经历了三十年的发展及多轮的技术更迭。第一代CAR-T细胞仅有作为胞外抗原结合域的单链抗体和作为胞内信号传导结构域的CD3 ζ 组成,第一代CAR-T细胞无法完全激活T细胞的活性,治疗效果不佳。第二代CAR-T细胞在第一代CAR-T细胞的基础上引入了一个共刺激结构域,提高了T细胞的体外增殖能力和细胞因子释放水平。第三代CAR-T细胞在第二代CAR-T细胞的基础上,增加了一个共刺激结构域,虽然可以提高T细胞的杀伤活性,但有可能诱发细胞因子的过量释放,导致严重的副反应。因此,新一代CAR-T细胞在第二代CAR-T细胞的基础上联合表达其他辅助因子,如联合表达IL-12或某些细胞因子受体的胞内结构域等,有助于提高肿瘤杀伤活性和安全性。

[0005] 然而,目前开发的CAR-T细胞存在增殖能力低下、衰竭增加、持续性低、毒副作用高等缺点。临床研究表明,在进行实体瘤的治疗中由于抑制性的肿瘤免疫微环境、免疫细胞存续能力较差等诸多因素的限制导致抗肿瘤药物“失效”进而引起肿瘤免疫逃逸。因此,通过表达辅助因子,促进免疫细胞对肿瘤杀伤能力的同时促进其增殖、延长存活时间以及提高记忆能力,是提高免疫细胞治疗效果的关键。

[0006] 综上所述,本领域迫切需要开发更高效、存续期更长的针对肿瘤细胞的工程化免疫细胞,从而既能在机体内长期存活并能抵抗肿瘤微环境抑制作用。

发明内容

[0007] 本发明的目的是针对恶性肿瘤(尤其是实体瘤)提供一种能更高效、治疗效果更好的工程化免疫细胞(如CAR-T细胞、TIL细胞)。

[0008] 本发明的又一目的是提供一种调控IL-7和TGF β 信号通路的工程化免疫细胞(如CAR-T细胞、TIL细胞)及其制法和应用。

[0009] 在本发明的第一方面,提供了一种工程化免疫细胞,所述工程化免疫细胞为T细胞、TIL细胞、或NK细胞,并且所述的免疫细胞具有以下特征:

[0010] (a)所述的免疫细胞表达外源的IL-7蛋白;和

[0011] (b)所述的免疫细胞表达外源的TGF β R1I显性抑制突变体蛋白或靶向内源TGF β R1I转录本的shRNA。

[0012] 在另一优选例中,所述的T细胞包括 $\alpha\beta$ T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、NKT细胞、MAIT细胞,或其组合。

[0013] 在另一优选例中,所述的工程化免疫细胞选自下组:

[0014] (i)嵌合抗原受体T细胞(CAR-T细胞);

[0015] (ii)嵌合抗原受体NK细胞(CAR-NK细胞);

[0016] (iii)嵌合抗原受体TIL细胞(CAR-TIL细胞)。

[0017] 在另一优选例中,所述的工程化免疫细胞为TIL细胞。

[0018] 在另一优选例中,所述的工程化免疫细胞为来自经放疗和/或化疗的患者的T细胞。

[0019] 在另一优选例中,所述的工程化免疫细胞为来自经放疗和/或化疗的患者的自体TIL细胞。

[0020] 在另一优选例中,所述的工程化免疫细胞为自体的或异体的。

[0021] 在另一优选例中,所述的IL-7蛋白和/或TGF β R1I显性抑制突变体可以是组成型表达或诱导型表达。

[0022] 在另一优选例中,所述的IL-7蛋白为膜结合型或分泌型。

[0023] 在另一优选例中,所述的TGF β R1I显性抑制突变体为膜结合型。

[0024] 在另一优选例中,所述免疫细胞表达嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR),其中所述CAR靶向肿瘤细胞的表面标志物。

[0025] 在另一优选例中,所述的CAR为组成型表达或诱导型表达。

[0026] 在另一优选例中,所述的IL-7蛋白的结构如式Z如下:

[0027] A-H-TM-D (Z)

[0028] 式中,

[0029] A为IL-7蛋白,或其活性片段,或其突变体;

[0030] H为无或铰链区;

[0031] TM为无或跨膜结构域;

[0032] D为无或降解结构域(包括野生型、或其突变体/修饰体);所述“-”为连接肽或肽键。

[0033] 在另一优选例中,所述A为人或非人哺乳动物的野生型或突变型IL-7蛋白。

[0034] 在另一优选例中,所述A的氨基酸序列如SEQ ID No:1所示。

[0035] 在另一优选例中,所述H为选自下组的蛋白的铰链区:CD8、CD28、CD137、IgG、或其组合。

[0036] 在另一优选例中,所述H为CD8蛋白的铰链区。

- [0037] 在另一优选例中,所述H为IgG蛋白Fc的铰链区。
- [0038] 在另一优选例中,所述H的氨基酸序列如SEQ ID No:2所示。
- [0039] 在另一优选例中,所述TM为选自下组的蛋白的跨膜区:CD28、CD3 epsilon、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、CD278、CD152、CD279、CD233、CD314、或其突变/修饰体、或其组合。
- [0040] 在另一优选例中,所述的TM为CD8的跨膜区。
- [0041] 在另一优选例中,所述的TM的氨基酸序列如SEQ ID No:3所示。
- [0042] 在另一优选例中,所述的D为氧依赖性降解结构域(ODD)或其部分序列;
- [0043] 在另一优选例中,ODD的氨基酸序列如SEQ ID No:35所示。
- [0044] 在另一优选例中,所述的IL-7蛋白和TGFβRII显性抑制突变体的结构如式I所示:
- [0045] Z0-Z1-Z2-D (I)
- [0046] 式中,
- [0047] Z0和Z2中的一个为IL-7蛋白,另一个为TGFβRII显性抑制突变体;
- [0048] Z1为无、或连接肽;
- [0049] D为无或降解结构域(包括野生型、或其突变体/修饰体);
- [0050] 所述“-”为无、连接肽或肽键。
- [0051] 在另一优选例中,Z0为IL-7蛋白,Z2为TGFβRII显性抑制突变体。
- [0052] 在另一优选例中,在所述的IL-7蛋白的编码序列和TGFβRII显性抑制突变体编码序列,通过内部核糖体进入位点(IRES)、2A连接肽的编码序列、或柔性连接肽的编码序列连接。
- [0053] 在另一优选例中,所述的连接肽选自下组:2A连接肽、或柔性连接肽。
- [0054] 在另一优选例中,所述2A连接肽为P2A(SEQ ID No:4)、T2A(SEQ ID No:5)。
- [0055] 在另一优选例中,所述的柔性连接肽为一个或多个G4S构成的连接肽,如4×GGGS(SEQ ID No:6)。
- [0056] 在另一优选例中,IRES的核苷酸序列如SEQ ID No:7所示。
- [0057] 在另一优选例中,所述IL-7蛋白(Z0)的氨基酸序列如SEQ ID No:1或SEQ ID No:8所示。
- [0058] 在另一优选例中,所述TGFβRII显性抑制突变体(Z2)的氨基酸序列如SEQ ID No:9或SEQ ID No:34所示。
- [0059] 在另一优选例中,所述的靶向内源TGFβRII转录本的shRNA抑制内源TGFβRII转录本的表达。
- [0060] 在另一优选例中,所述的TGFβRII显性抑制突变体蛋白可以替换为靶向内源TGFβRII转录本(SEQ ID No:10)的shRNA表达框。
- [0061] 在另一优选例中,所述的shRNA表达框由启动子和shRNA编码序列组成。
- [0062] 在另一优选例中,所述的shRNA表达框的启动子为U6启动子(SEQ ID No:11)。
- [0063] 在另一优选例中,所述的shRNA的结合位点位于TGFβRII基因开放读码框的703-738nt内(SEQ ID No:12)。
- [0064] 在另一优选例中,所述的shRNA的结合的核苷酸序列如SEQ ID No:13、SEQ ID No:14、SEQ ID No:15、SEQ ID No:16或SEQ ID No:17所示。

[0065] 在另一优选例中,所述的shRNA表达框的核苷酸序列如SEQ ID No:18、SEQ ID No:19、SEQ ID No:20、SEQ ID No:21或SEQ ID No:22所示。

[0066] 在另一优选例中,所述细胞为一种嵌合抗原受体T细胞(CAR-T细胞),所述CAR-T细胞具有以下一个或多个特征:

[0067] (a)所述CAR-T细胞表达外源的IL-7蛋白;

[0068] (b)所述CAR-T细胞表达外源的TGF β RII显性抑制突变体蛋白或靶向内源TGF β RII转录本的shRNA;和

[0069] (c)任选的所述CAR-T细胞表达嵌合抗原受体CAR。

[0070] 在另一优选例中,当所述CAR-T细胞接触诱导剂或诱导条件时,所述CAR-T细胞诱导表达CAR分子和/或IL-7和/或TGF β RII显性抑制突变体蛋白。

[0071] 在另一优选例中,在所述的CAR-T细胞中,CAR、IL-7和TGF β RII显性抑制突变体蛋白是串联表达的。

[0072] 在另一优选例中,在所述的CAR-T细胞中,CAR、IL-7、TGF β RII显性抑制突变体蛋白和靶向内源TGF β RII的shRNA是各自独立地表达的。

[0073] 在另一优选例中,所述“激活”指所述CAR与肿瘤细胞的表面标志物结合。

[0074] 在另一优选例中,所述“肿瘤的表面标志物”指肿瘤表面的特异性抗原。

[0075] 在另一优选例中,所述的嵌合抗原受体CAR定位于所述工程化免疫细胞的细胞膜。

[0076] 在另一优选例中,所述的嵌合抗原受体CAR定位于所述CAR-T细胞的细胞膜。

[0077] 在另一优选例中,所述的IL-7蛋白和/或TGF β RII显性抑制突变体蛋白定位于所述CAR-T细胞的细胞膜。

[0078] 在另一优选例中,所述的CAR靶向肿瘤细胞的表面标志物,所述标志物选自下组:CD19、CD20、CD22、CD123、CD47、CD138、CD33、CD30、CD271、GUCY2C、CD24、CD133、CD44、CD166、CD276、ABCB5、ALDH1、间皮素(mesothelin,MSLN)、EGFR、GPC3、BCMA、ErbB2、NKG2D配体(ligands)、LMP1、EpCAM、VEGFR-1、Lewis-Y、ROR1、Claudin18.2、CEA、TAG-72、TROP2、CD147、CLDN6。

[0079] 在另一优选例中,所述CAR的结构如式II所示:

[0080] L-scFv1-H-TM-C-CD3 ζ -D(II)

[0081] 式中,

[0082] L为无或信号肽序列;

[0083] scFv1为靶向肿瘤细胞的表面标志物的抗原结合结构域(如抗体或其活性片段);

[0084] H为无或铰链区;

[0085] TM为跨膜结构域;

[0086] C为共刺激信号结构域;

[0087] CD3 ζ 为源于CD3 ζ 的胞浆信号传导序列(包括野生型、或其突变体/修饰体);

[0088] D为无或降解结构域(包括野生型、或其突变体/修饰体);

[0089] 所述“-”为连接肽或肽键。

[0090] 在另一优选例中,所述的抗原结合结构域(scFv1)选自下组:单链抗体scFv、单域抗体VHH、受体蛋白的胞外域、或其组合。

[0091] 在另一优选例中,所述的肿瘤细胞的表面标志物为CD133(SEQ ID No:23)或CEA

(SEQ ID No:24)。

[0092] 在另一优选例中,所述L分别选自下组的蛋白的信号肽:CD8、GM-CSF、CD4、CD28、CD137、或其突变/修饰体、或其组合。

[0093] 在另一优选例中,所述的L的氨基酸序列如SEQ ID No:25所示。

[0094] 在另一优选例中,所述H选自下组的蛋白的铰链区:CD8、CD28、CD137、IgG、或其组合。

[0095] 在另一优选例中,所述H选自下组的IgG蛋白Fc或CD8的铰链区。

[0096] 在另一优选例中,所述H的氨基酸序列如SEQ ID No:26所示或SEQ ID No:27。

[0097] 在另一优选例中,所述TM选自下组的蛋白的跨膜区:CD28、CD3 epsilon、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、CD278、CD152、CD279、CD233、CD314、或其突变/修饰体、或其组合。

[0098] 在另一优选例中,所述的TM为CD8的跨膜区。

[0099] 在另一优选例中,所述的TM的氨基酸序列如SEQ ID No:3所示。

[0100] 在另一优选例中,所述C选自下组的蛋白的共刺激结构域:OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD70、CD134、4-1BB (CD137)、PD1、Dap10、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278)、NKG2D、GITR、OX40L、或其突变/修饰体、或其组合。

[0101] 在另一优选例中,C为4-1BB来源的共刺激结构域。

[0102] 在另一优选例中,所述的C的氨基酸序列如SEQ ID No:28所示。

[0103] 在另一优选例中,所述的CD3 ζ 的氨基酸序列如SEQ ID No:29所示。

[0104] 在另一优选例中,所述scFv1的氨基酸序列如SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:31或SEQ ID NO:32所示。

[0105] 在另一优选例中,除了式II所示的第一CAR之外,所述CAR-T细胞还含有用于针对第二抗原的第二CAR,所述的第二CAR的结构如式III所示:

[0106] L-scFv2-H-TM-C-CD3 ζ -D (III)

[0107] 式中,

[0108] L为无或信号肽序列;

[0109] scFv2为靶向第二肿瘤细胞的表面标志物的抗原结合结构域(如抗体或其活性片段);

[0110] H为无或铰链区;

[0111] TM为跨膜结构域;

[0112] C为共刺激结构域;

[0113] CD3 ζ 为源于CD3 ζ 的胞浆信号传导序列或其突变/修饰体;

[0114] D为无或降解结构域(包括野生型、或其突变体/修饰体);

[0115] 所述“-”为连接肽或肽键。

[0116] 在另一优选例中,所述的抗原结合结构域(scFv2)选自下组:单链抗体scFv、单域抗体VHH、受体蛋白的胞外域、或其组合。

[0117] 在另一优选例中,式III中的scFv2与式II中的scFv1靶向不同的抗原。

[0118] 在另一优选例中,所述scFv2为靶向肿瘤抗原的抗体单链可变区或单域抗体序列及其活性片段。

[0119] 在另一优选例中,所述scFv2为靶向选自下组抗原的抗体单链可变区或单域抗体序列及其活性片段:CD19、CD20、CD22、CD123、CD47、CD138、CD33、CD30、CD271、GUCY2C、CD24、CD133、CD44、CD166、CD276、ABCB5、ALDH1、间皮素(mesothelin,MSLN)、EGFR、GPC3、BCMA、ErbB2、NKG2D配体(ligands)、LMP1、EpCAM、VEGFR-1、Lewis-Y、ROR1、Claudin18.2、TROP2、CEA、TAG-72、CD147、CLDN6或其组合。

[0120] 在另一优选例中,式II所示的第一CAR和式III所示的第二CAR可合而为一,从而构成如式IVa或IVb所示的CAR:

[0121] L-scFv1-scFv2-H-TM-C-CD3 ζ -D (IVa)

[0122] L-scFv2-scFv1-H-TM-C-CD3 ζ -D (IVb)

[0123] 式中,

[0124] L为无或信号肽序列;

[0125] scFv1为靶向第一肿瘤细胞的表面标志物的抗体或其活性片段;

[0126] scFv2为靶向第二肿瘤细胞的表面标志物的抗体或其活性片段;

[0127] H为无或铰链区;

[0128] TM为跨膜结构域;

[0129] C为共刺激结构域;

[0130] CD3 ζ 为源于CD3 ζ 的胞浆信号传导序列或其突变/修饰体;

[0131] D为无或降解结构域(包括野生型、或其突变体/修饰体);

[0132] 所述“-”为连接肽或肽键。

[0133] 在本发明的第二方面,提供了一种制备如本发明第一方面所述的工程化免疫细胞的方法,包括以下步骤:

[0134] (A)提供一待改造的免疫细胞;和

[0135] (B)对所述的免疫细胞进行改造,从而使得所述的免疫细胞表达外源的IL-7蛋白和外源的TGF β RII显性抑制突变体蛋白或靶向内源TGF β RII转录本的shRNA,从而获得如本发明第一方面所述的工程化免疫细胞。

[0136] 在另一优选例中,在步骤(B)中,包括:

[0137] (B1)将表达IL-7的第一表达盒导入所述免疫细胞;

[0138] (B2)将表达TGF β RII显性抑制突变体或靶向内源TGF β RII转录本的shRNA的第二表达盒导入所述免疫细胞;

[0139] 其中所述的步骤(B1)和(B2)可以按任意次序进行,或合并进行。

[0140] 在另一优选例中,所述的步骤(B1)可在步骤(B2)之前、之后、同时、或交替进行。

[0141] 在另一优选例中,所述的步骤(B)还包括(B3)将表达嵌合抗原受体CAR的第三表达盒导入所述免疫细胞;其中所述的步骤(B1)、(B2)、和(B3)可以按任意次序进行,或合并进行。

[0142] 在另一优选例中,所述的“合并进行”指将所述的第一表达盒、第二表达盒、和任选的第三表达盒中的两个或三个合并为一个表达盒,并导入免疫细胞。

[0143] 在另一优选例中,提供了一种制备所述的CAR-免疫细胞的方法,包括以下步骤:

[0144] (A)提供一种待改造的免疫细胞;

[0145] (B)对所述的免疫细胞进行改造,使得所述的免疫细胞表达所述的CAR分子以及外

源的IL-7蛋白和外源的TGFBR11显性抑制突变体蛋白或靶向内源TGFBR11转录本的shRNA,从而获得如本发明第一方面所述的工程化免疫细胞。

[0146] 在另一优选例中,所述的免疫细胞为T细胞、TIL细胞、或NK细胞。

[0147] 在另一优选例中,在步骤(B)中,包括:将表达IL-7的第一表达盒、表达TGFBR11显性抑制突变体或靶向内源TGFBR11转录本的shRNA的第二表达盒、和任选的表达所述CAR的第三表达盒导入所述免疫细胞;其中所述的导入步骤可以按任意次序进行,或合并进行。

[0148] 在另一优选例中,对于所述的第一、第二和第三表达盒中任何两个表达盒(以第一表达盒和第二表达盒为例),其转录方向是同向的($\rightarrow\rightarrow$)、相向的($\rightarrow\leftarrow$)或相背的($\leftarrow\rightarrow$)。

[0149] 在另一优选例中,所述的第一表达盒、第二表达盒和第三表达盒位于相同或不同的载体上。

[0150] 在另一优选例中,所述的第一表达盒、第二表达盒和第三表达盒位于同一载体。

[0151] 在另一优选例中,当所述的CAR分子、外源的IL-7蛋白和外源的TGFBR11显性抑制突变体蛋白中的两个或三个串联表达时,在两个蛋白之间,还包括连接肽或IRES元件。

[0152] 在另一优选例中,所述连接肽为P2A或T2A或 $4\times$ GGGS。

[0153] 在另一优选例中,所述的载体为病毒载体,较佳地所述病毒载体含有串联形式的第一、第二和第三表达盒。

[0154] 在另一优选例中,所述的载体选自下组:DNA、RNA、质粒、慢病毒载体、腺病毒载体、逆转录病毒载体、转座子、其他基因转移系统、或其组合。

[0155] 在另一优选例中,所述的载体为pCDH系列慢病毒载体。

[0156] 在本发明的第三方面,提供了一种制剂,所述制剂含有如本发明第一方面所述的工程化免疫细胞,以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0157] 在另一优选例中,所述制剂含有本发明所述的CAR-T细胞,以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0158] 在另一优选例中,所述制剂为液态制剂。

[0159] 在另一优选例中,所述制剂的剂型包括注射剂。

[0160] 在另一优选例中,所述制剂中所述工程化免疫细胞(如CAR-T细胞)的浓度为 1×10^3 - 1×10^8 个细胞/ml,较佳地 1×10^4 - 1×10^7 个细胞/ml。

[0161] 在本发明的第四方面,提供了一种如本发明第一方面所述的工程化免疫细胞的用途,用于制备预防和/或治疗癌症的药物或制剂。

[0162] 在另一优选例中,提供了如本发明第一方面所述的CAR-T细胞和TIL细胞的用途,用于制备预防和/或治疗癌症或肿瘤的药物或制剂。

[0163] 在另一优选例中,所述制剂含有CAR-T细胞和TIL细胞,以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0164] 在另一优选例中,所述肿瘤包括实体瘤。

[0165] 在另一优选例中,所述肿瘤选自下组:结直肠癌、胃癌、胰腺癌、食管癌、乳腺癌、卵巢癌或肝癌。

[0166] 在本发明的第五方面,提供了一种用于制备如本发明第一方面所述的工程化免疫细胞的试剂盒,所述试剂盒含有容器,以及位于容器内的:

[0167] (1)第一核酸序列,所述第一核酸序列含有用于表达IL-7的第一表达盒;和

[0168] (2) 第二核酸序列,所述第二核酸序列含有用于表达TGFβRII显性抑制突变体或靶向内源TGFβRII转录本的shRNA的第二表达盒。

[0169] 在另一优选例中,提供了一种用于制备如本发明第一方面所述的工程化免疫细胞的试剂盒,所述试剂盒含有容器,以及位于容器内的:

[0170] (1) 第一核酸序列,所述第一核酸序列含有用于表达IL-7的第一表达盒;

[0171] (2) 第二核酸序列,所述第二核酸序列含有用于表达TGFβRII显性抑制突变体或靶向内源TGFβRII转录本的shRNA的第二表达盒;和

[0172] (3) 任选的第三核酸序列,所述第三核酸序列含有用于表达所述CAR的第三表达盒。

[0173] 在另一优选例中,所述的第一、第二和第三核酸序列为独立的或相连的。

[0174] 在另一优选例中,所述的第一、第二和第三核酸序列位于相同或不同的容器内。

[0175] 在另一优选例中,所述的第一、第二和第三核酸序列位于相同或不同的载体上。

[0176] 在另一优选例中,所述的第一、第二和第三核酸序列位于同一载体。

[0177] 在另一优选例中,当所述的第一、第二和第三核酸序列中两个或三个位于同一载体时,在两个相邻的表达盒之间还包括用于表达连接肽的编码序列或IRES元件。

[0178] 在另一优选例中,所述连接肽为P2A或T2A或4×GGGS。

[0179] 在另一优选例中,所述的载体为病毒载体,较佳地所述病毒载体含有串联形式的第一、第二和第三核酸序列。

[0180] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

附图说明

[0181] 图1显示了辅助因子的结构设计。

[0182] 图2显示了靶向CEA的二代CAR和四代CAR的结构设计。

[0183] 图3显示了靶向CD133的二代CAR和四代CAR的结构设计。

[0184] 图4显示了流式检测增强型TIL细胞中各辅助因子的表达率。

[0185] 图5显示了增强型TIL细胞中IL-7的分泌水平。

[0186] 图6显示了流式检测CEA CAR-T细胞的CAR分子表达率。

[0187] 图7显示了流式检测CEA CAR-T细胞的dnTGFβRII表达率。

[0188] 图8显示了CEA CAR-T细胞的IL-7分泌水平检测。

[0189] 图9显示了流式检测CD133 CAR-T细胞的CAR分子表达率。

[0190] 图10显示了流式检测CD133 CAR-T细胞的dnTGFβRII的表达率。

[0191] 图11显示了CD133 CAR-T细胞的IL-7分泌水平检测。

[0192] 图12显示了增强型TIL细胞对肝癌细胞的杀伤效果检测。

[0193] 图13显示了增强型TIL细胞的IFN-γ释放水平。

[0194] 图14显示了联合表达IL-7和dnTGFβRII的CEA CAR-T细胞对HT55的杀伤效果检测。

[0195] 图15显示了联合表达IL-7和dnTGFβRII的CD133 CAR-T细胞对SW620的杀伤效果检测。

[0196] 图16显示了联合表达IL-7和dnTGFβRII的CD133 CAR-T细胞的体内抑瘤效果。

[0197] 图17显示了联合表达IL-7和dnTGFβRII融合蛋白的CAR-T细胞对多种实体瘤细胞的杀伤效果。

[0198] 图18显示了联合表达IL-7和dnTGFβRII融合蛋白的CAR-T细胞的体外增殖能力。

具体实施方式

[0199] 本发明人经过广泛而深入地研究,经过大量的筛选,首次通过同时调控IL-7和TGFβ通路,即上调IL-7通路和抑制TGFβ通路,显著提高工程化免疫细胞的IL-7信号的激活程度和显著提高对肿瘤微环境的抵抗能力。实验表明,本发明的工程化免疫细胞(以TIL和CAR-T细胞为例)不仅显著提高了免疫细胞的增殖能力、减少衰竭、增强对免疫抑制微环境的抵抗力,而且与表达IL-7×CCL19的免疫细胞相比,还意外地降低了副作用。在此基础上完成了本发明。

[0200] 本发明以TIL和CAR-T细胞为例,代表性地对本发明的工程化免疫细胞进行详细说明。本发明的工程化免疫细胞不限于上下文所述的TIL和CAR-T细胞,本发明的工程化免疫细胞具有与上下文所述的TIL和CAR-T细胞相同或类似的技术特征和有益效果。具体地,当免疫细胞表达嵌合抗原受体CAR时,NK细胞或TIL细胞等同于T细胞(即,T细胞可替换为NK细胞或TIL细胞)。

[0201] 术语

[0202] 为了可以更容易地理解本公开,首先定义某些术语。如本申请中所使用的,除非本文另有明确规定,否则以下术语中的每一个应具有下面给出的含义。

[0203] 术语“约”可以是指在本领域普通技术人员确定的特定值或组成的可接受误差范围内的值或组成,其将部分地取决于如何测量或测定值或组成。

[0204] 术语“给予”或“施用”(administer or administration)是指使用本领域技术人员已知的各种方法和递送系统中的任一种将本发明的产品引入受试者,包括静脉内、瘤内、肌内、皮下、腹膜内、脊髓或其它肠胃外给药途径,例如通过注射或输注。

[0205] 抗体

[0206] 如本文所用,术语“抗体”(Ab)应包括但不限于免疫球蛋白,其特异性结合抗原并包含通过二硫键互连的至少两条重(H)链和两条轻(L)链,或其抗原结合部分。每条H链包含重链可变区(本文缩写为VH)和重链恒定区。重链恒定区包含三个恒定结构域CH1、CH2和CH3。每条轻链包含轻链可变区(本文缩写为VL)和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个恒定结构域CL。VH和VL区可以进一步细分为称为互补决定区(CDR)的高变区,其散布有更保守的称为框架区(FR)的区域。每个VH和VL包含三个CDR和四个FR,从氨基末端到羧基末端按照以下顺序排列:FR1,CDR1,FR2,CDR2,FR3,CDR3,FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。

[0207] “抗体”也包括单域抗体(也称纳米抗体)。单域抗体是在羊驼、骆驼、鲨鱼等动物外周血液中存在一种天然缺失轻链的抗体,该抗体只包含一个重链可变区(VHH)和两个常规的CH2与CH3区。单独克隆并表达出来的VHH结构具有与原重链抗体相当的结构稳定性以及与抗原的结合活性,是已知的可结合目标抗原的最小单位。

[0208] 抗原结合结构域

[0209] 如本文所用,“抗原结合结构域”、“单链抗体片段”均指具有抗原结合活性的Fab片段,Fab'片段,F(ab')₂片段,单一Fv片段,或单域抗体的VHH片段。Fv抗体含有抗体重链可变区、轻链可变区,但没有恒定区,并具有全部抗原结合位点的最小抗体片段。一般的,Fv抗体还包含VH和VL结构域之间的多肽接头,且能够形成抗原结合所需的结构。抗原结合结构域通常是scFv(single-chain variable fragment)。单链抗体优选是由一条核苷酸链编码的一条氨基酸链序列。

[0210] 此外,本发明的免疫细胞还可含有额外的特异性识别肿瘤高表达的抗原的抗体,较佳地为单链抗体、Fv抗体、或单域抗体。

[0211] 嵌合抗原受体(CAR)

[0212] 如本文所用,嵌合免疫抗原受体(Chimeric antigen receptor,CAR)包括细胞外结构域、任选的铰链区、跨膜结构域、和细胞内结构域。胞外结构域包括任选的信号肽和靶点特异性结合结构域(也称为抗原结合结构域)。细胞内结构域包括共刺激结构域和CD3 ζ 链部分。CAR在T细胞中表达时,胞外段可识别一个特异的抗原,随后通过胞内结构域转导该信号,引起细胞的活化增殖、细胞溶解毒性和分泌细胞因子如IL-2和IFN- γ 等,影响肿瘤细胞,导致肿瘤细胞不生长、被促使死亡或以其他方式被影响,并导致患者的肿瘤负荷缩小或消除。抗原结合结构域优选与来自共刺激分子和CD3 ζ 链中的一个或多个的细胞内结构域融合。优选地,抗原结合结构域与4-1BB信号传导结构域和CD3 ζ 信号结构域组合的细胞内结构域融合。

[0213] 嵌合抗原受体T细胞(CAR-T细胞)

[0214] 如本文所用,术语“CAR-T细胞”、“CAR-T”、“本发明CAR-T细胞”均指本发明第一方面所述的CAR-T细胞。

[0215] CAR-T细胞较其它基于T细胞的治疗方式存在以下优势:(1)CAR-T细胞的作用过程不受MHC的限制;(2)鉴于很多肿瘤细胞表达相同的肿瘤抗原,针对某一种肿瘤抗原的CAR基因构建一旦完成,便可以广泛利用;(3)CAR既可以利用肿瘤蛋白质抗原,又可利用糖脂类非蛋白质抗原,扩大了肿瘤抗原的靶点范围;(4)使用患者自体细胞降低了排异反应的风险;(5)CAR-T细胞具有免疫记忆功能,可以长期在体内存活。

[0216] 在本发明的免疫细胞中,激活IL-7通路的构建物(construct)、抑制TGF β 通路的构建物以及CAR分子构建物,可以通过各种不同方式进行组合,代表性的方式包括(但并不限于):2A肽、柔性连接肽、IRES元件、多启动子、共转染、共转导等形式。

[0217] 嵌合抗原受体NK细胞(CAR-NK细胞)

[0218] 如本文所用,术语“CAR-NK细胞”、“CAR-NK”、“本发明CAR-NK细胞”均指本发明第一方面所述的CAR-NK细胞。

[0219] 自然杀伤(NK)细胞是一类主要的免疫效应细胞,通过非抗原特异性途径去保护机体免受病毒感染和肿瘤细胞的侵袭。通过工程化(基因修饰)的NK细胞可能获得新的功能,包括特异性识别肿瘤抗原的能力及具有增强的抗肿瘤细胞毒作用。

[0220] 与自体CAR-T细胞相比,CAR-NK细胞还具有以下优点,例如:(1)通过释放穿孔素和颗粒酶直接杀伤肿瘤细胞,而对机体正常的细胞没有杀伤作用;(2)它们释放很少量的细胞因子从而降低了细胞因子风暴的危险;(3)体外极易扩增及发展为“现成的”产品。除此之外,与CAR-T细胞治疗类似。

[0221] TIL细胞

[0222] 除了CAR-T细胞疗法外,肿瘤浸润淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocytes, TIL)疗法也能高效识别并杀伤肿瘤细胞,达到癌症治疗的效果。

[0223] TIL是一种从肿瘤组织中分离出的对肿瘤细胞有反应的浸润性免疫细胞。这些免疫细胞具有识别和攻击肿瘤细胞的能力,目前TIL细胞也被用于治疗肿瘤患者。与其他免疫疗法相比,如CAR-T细胞疗法、TCR-T细胞疗法以及PD-1/PD-L1免疫检查点抑制剂,TIL疗法具有特异性更强,安全性更高、治疗后复发率低等优势。然而,肿瘤组织中的TIL细胞数量较少且活性通常被免疫微环境所抑制,在临床治疗时需制备极大量TIL细胞才有可能获得理想的抗肿瘤效果。因此,TIL疗法还需要继续优化。

[0224] 在本发明中,通过同时激活TIL细胞中的IL-7通路并抑制TGF β 通路,出乎意料地获得了性能显著改善的新型TIL细胞。

[0225] IL-7

[0226] 人白细胞介素7(interleukin-7, IL-7)是一种多效细胞因子,具有广泛的免疫效应。长期以来,对于IL-7的认识一直集中于其对B细胞和T细胞的生长、存活及分化的影响。外源性注射的IL-7在体内可以增强机体抗肿瘤免疫。IL-7强大的免疫效应,尤其是其调节T细胞增殖、维持细胞内环境稳定、增强T免疫应答等功能,使IL-7作为一种免疫调节因子越来越受到关注。

[0227] 在本发明中,通过激活IL-7通路来提高工程化免疫细胞的治疗效果。代表性的激活IL-7通路的方法,包括(但并不限于):表达分泌型或膜结合型的IL-7。

[0228] 在本发明中,可以将IL-7与任何能锚定于细胞膜上的结构融合表达,从而实现膜结合型IL-7的表达。

[0229] 在本发明中,术语“IL-7”包括人及其他哺乳动物的野生型和突变型的IL-7。应理解,该术语还包括IL-7类似物或IL-7的衍生蛋白,只要其具有或保留了野生型IL-7的基本功能。

[0230] TGF- β

[0231] 转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)是一个由结构相关的多功能细胞因子组成的蛋白超家族,包括TGF- β 1/2/3亚型、活化素、骨形成蛋白和生长分化因子等。TGF- β 超家族配体通过7种I型TGF- β 超家族受体(激活素样激酶-1至7)和5种II型TGF- β 超家族受体(T β RII、ActRII、ActRIIB、AMHRII和BMPRII)调控细胞功能,在胚胎发育、组织修复和骨骼肌、心血管、神经、内分泌和免疫系统的稳态中发挥着重要作用。

[0232] TGF- β 是一种肿瘤促进因子,能够诱导肿瘤细胞的上皮-间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT),促进肿瘤细胞侵袭和转移。此外,TGF- β 是T细胞应答的关键调节因子,在调节免疫应答中扮演着重要的角色,可以调控几乎每一种固有和适应性免疫细胞的功能,包括树突状细胞、B细胞、NK细胞、先天淋巴细胞和粒细胞等。在肿瘤晚期,大多数肿瘤细胞均可分泌TGF- β 。TGF- β 的浓度一旦升高,便可以阻断未成熟的T细胞向Th1细胞方向分化,并促进其向Treg亚群方向转化,同时抑制树突状细胞的抗原递呈功能,从而导致肿瘤细胞的免疫逃逸。

[0233] 在本发明中,代表性的抑制TGF β 通路的方式,包括但并不限于:过表达TGF β 受体的显性抑制突变体(dnTGF β RII)或TGF β 的抗体,通过RNAi的方式敲降TGF β 受体,通过基因敲除

的方式敲除TGFβ受体 (TGFβ受体包括TGFβRI和TGFβRII)。一种代表性的通过RNAi的方式是利用靶向内源TGFβRII转录本的shRNA。

[0234] 应理解,在本发明中,dnTGFβRII可以替换为TGFβR抑制剂(膜结合/分泌型)、TGFβR信号通路中的相关蛋白的抑制剂/干扰相关基因的表达手段、免疫细胞中敲除、敲降TGFβ的受体TGFβRII,或过表达其显性抑制突变体dnTGFβRII,或过表达膜结合型TGFβ抗体。

[0235] TGFβRII显性抑制突变体(dnTGFβRII)

[0236] 在TGFβ的信号通路中,TGFβ通过与TGFβRI和TGFβRII的结合启动相关信号的传到。具体的,TGFβ与TGFβRI和TGFβRII的胞外域结合后,可以使TGFβRI和TGFβRII在空间位置上相互靠近,并使TGFβRII的胞内域激活TGFβRI的胞内域且磷酸化,使TGFβRI表现出激酶活性,进而使转录因子Smad磷酸化并进入细胞核调控下游基因的表达。dnTGFβRII是TGFβRII的胞内域缺失突变体,该突变体仍可通过胞外域与TGFβ和TGFβRI形成复合物,但不能磷酸化TGFβRI的胞内域。因此,过表达的dnTGFβRII可以通过竞争作用,使内源的TGFβRII无法与结合TGFβ和TGFβRI结合或激活下游的Smad,从而达到阻断TGFβ信号通路的效果。

[0237] 在本发明中,通过免疫细胞中敲降或敲除TGFβ的受体TGFβRII,或过表达其显性抑制突变体dnTGFβRII,可以有效阻断细胞内源TGFβRII的信号通路,从而降低TGFβ对免疫细胞产生的抑制作用,保持免疫细胞在肿瘤微环境中的活性,有效提高肿瘤治疗的效果。

[0238] 表达盒

[0239] 如本文所用,“表达盒”或“本发明表达盒”包括第一表达盒、第二表达盒和第三表达盒。本发明表达盒如本发明第五方面所述,其中,所述第一表达盒表达外源的IL-7蛋白,所述第二表达盒表达外源的TGFβRII显性抑制突变体蛋白,而任选的第三表达盒表达所述CAR。

[0240] 在本发明中,IL-7蛋白、TGFβRII显性抑制突变体蛋白和CAR分子可以各自独立地组成型表达或诱导型表达。

[0241] 在诱导表达情况下,在所述CAR-T细胞被相应诱导剂或相应诱导条件激活时,第一表达盒表达IL-7蛋白,第二表达盒表达TGFβRII显性抑制突变体蛋白,第三表达盒表达CAR分子。这样,在本发明CAR-T细胞在未接触相应诱导剂时,第一表达盒不表达IL-7蛋白,第二表达盒不表达TGFβRII显性抑制突变体蛋白,而第三表达盒不表达CAR分子。

[0242] 在一个实施方式中,所述第一表达盒、第二表达盒和/或第三表达盒分别还包括启动子和/或终止子。第一表达盒、第二表达盒和第三表达盒的启动子可以为组成型或诱导型启动子。

[0243] 载体

[0244] 本发明还提供了含有本发明表达盒的载体。源于逆转录病毒诸如慢病毒的载体是实现长期基因转移的合适工具,因为它们允许转基因长期、稳定地整合于细胞基因组中并随子细胞基因组的复制而复制。慢病毒载体具有超过源自致癌逆转录病毒诸如鼠科白血病病毒的载体的优点,因为它们可转导非增殖的细胞,且具有低免疫原性的优点。

[0245] 通常,可通过常规操作将本发明的表达盒或核酸序列连接至启动子下游,并将其并入表达载体。该载体可整合至真核细胞基因组中并随之复制。典型的克隆载体包含可用于调节期望核酸序列表达的转录和翻译终止子、初始序列和启动子。

[0246] 本发明的表达载体也可用于标准的基因传递方案,用于核酸免疫和基因疗法。基

因传递的方法在本领域中是已知的。见例如美国专利号5,399,346、5,580,859、5,589,466, 在此通过引用全文并入。

[0247] 所述表达盒或核酸序列可被克隆入许多类型的载体。例如,该表达盒或核酸序列可被克隆入如此载体,其包括但不限于质粒、噬菌粒、噬菌体衍生物、动物病毒和粘粒。特定的感兴趣载体包括表达载体、复制载体等。

[0248] 进一步地,表达载体可以以病毒载体形式提供给细胞。病毒载体技术在本领域中是公知的并在例如Molecular Cloning:A Laboratory Manual (Sambrook等,Cold Spring Harbor Laboratory,New York,2001)和其他病毒学和分子生物学手册中进行了描述。可用作载体的病毒包括但不限于逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒和慢病毒。通常,合适的载体包含至少一种在有机体中起作用的复制起点、启动子序列、方便的限制酶位点和一个或多个可选择的标记(例如,W001/96584;W001/29058;和美国专利号6,326,193)。

[0249] 已经有许多基于病毒的系统被开发出来,并用于哺乳动物细胞的基因转导。例如,逆转录病毒提供了用于基因传递系统的方便的平台。可利用在本领域中已知的技术将选择的基因插入载体并包装入逆转录病毒颗粒。该重组病毒随后可被分离和传递至体内或离体的对象细胞。许多逆转录病毒系统在本领域中是已知的。在一个实施方式中,使用慢病毒载体。许多DNA病毒系统在本领域中是已知的。在一些实施方式中,使用腺病毒载体。许多腺病毒载体在本领域中是已知的。

[0250] 额外的启动子元件,例如增强子,可以调节转录开始的频率。通常地,这些元件位于起始位点上游的30-110bp区域中,尽管最近已经显示许多启动子也包含起始位点下游的功能元件。启动子元件之间的间隔经常是柔性的,以便当元件相对于另一个元件被倒置或移动时,保持启动子功能。在胸苷激酶(tk)启动子中,启动子元件之间的间隔可被增加隔开50bp,活性才开始下降。取决于启动子,表现出单个元件可合作或独立地起作用,以启动转录。

[0251] 合适的启动子的一个例子为巨细胞病毒(CMV)启动子序列。该启动子序列为能够驱动可操作地连接至其上的任何多核苷酸序列高水平表达的强组成型启动子序列。合适的启动子的另一个例子为延伸生长因子-1 α (EF-1 α)。然而,也可使用其他组成型启动子序列,包括但不限于类人猿病毒40(SV40)早期启动子、小鼠乳癌病毒(MMTV)、人免疫缺陷病毒(HIV)长末端重复(LTR)启动子、MoMuLV启动子、鸟类白血病毒启动子、艾伯斯坦-巴尔病毒(Epstein-Barr virus,EBV)即时早期启动子、鲁斯氏肉瘤病毒启动子、以及人基因启动子,诸如但不限于肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、血红素启动子和肌酸激酶启动子。进一步地,本发明不应被限于组成型启动子的应用。诱导型启动子也被考虑为本发明的一部分。诱导型启动子的使用提供了分子开关,能够在需要时,启动连接诱导型启动子的多核苷酸序列的表达,或在不需要时关闭表达。诱导型启动子的例子包括但不限于金属硫蛋白启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子和四环素启动子。

[0252] 被引入细胞的表达载体也可包含可选择的标记基因或报告基因中的任一个或两者,以便于通过病毒载体从被转染或感染的细胞群中鉴定和选择表达细胞。在其他方面,可选择的标记可被携带在单独一段DNA上并用于共转染程序。可选择的标记基因和报告基因两者的侧翼都可具有适当的调节序列,以便能够在宿主细胞中表达。有用的可选择标记基因包括例如抗生素抗性基因,诸如neomycin等等。

[0253] 将基因引入细胞和将基因表达入细胞的方法在本领域中是已知的。在表达载体的内容中,载体可通过在本领域中的任何方法容易地引入宿主细胞,例如,哺乳动物(如人T细胞)、细菌、酵母或昆虫细胞。例如,表达载体可通过物理、化学或生物学手段转移入宿主细胞。

[0254] 将多核苷酸引入宿主细胞的物理方法包括磷酸钙沉淀、阳离子复合物转染法、脂质转染法、粒子轰击、微注射、电穿孔等等。生产包括载体和/或外源核酸的细胞的方法在本领域中是公知的。见例如Molecular Cloning:A Laboratory Manual (Sambrook等,Cold Spring Harbor Laboratory,New York,2001)。将多核苷酸引入宿主细胞的优选方法为脂质体法转染法和阳离子复合物聚乙烯亚胺转染法。

[0255] 将多核苷酸引入宿主细胞的生物学方法包括使用DNA和RNA载体。病毒载体,特别是逆转录病毒载体,已经成为最广泛使用的将基因插入哺乳动物例如人细胞的方法。其他病毒载体可源自慢病毒、痘病毒、单纯疱疹病毒I、腺病毒和腺伴随病毒等等。例如见美国专利号5,350,674和5,585,362。

[0256] 将多核苷酸引入宿主细胞的化学手段包括胶体分散系统,诸如大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠;和基于脂质的系统,包括水包油乳剂、胶束、混合胶束和脂质体。用作体外和体内传递工具(delivery vehicle)的示例性胶体系统为脂质体(例如,人造膜囊)。

[0257] 在使用非病毒传递系统的情况下,示例性传递工具为脂质体。考虑使用脂质制剂,以将核酸引入宿主细胞(体外、离体(ex vivo)或体内)。在另一方面,该核酸可与脂质相关联。与脂质相关联的核酸可被封装入脂质体的水性内部中,散布在脂质体的脂双层内,经与脂质体和寡核苷酸两者都相关联的连接分子附接至脂质体,陷入脂质体,与脂质体复合,分散在包含脂质的溶液中,与脂质混合,与脂质联合,作为悬浮液包含在脂质中,包含在胶束中或与胶束复合,或以其他方式与脂质相关联。与组合物相关联的脂质、脂质/DNA或脂质/表达载体不限于溶液中的任何具体结构。它们也可简单地被散布在溶液中,可能形成大小或形状不均一的聚集体。脂质为脂类物质,其可为天然发生或合成的脂质。例如,脂质包括脂肪小滴,其天然发生在细胞质以及包含长链脂肪族烃和它们的衍生物诸如脂肪酸、醇类、胺类、氨基醇类和醛类的该类化合物中。

[0258] 在本发明的一个优选的实施方式中,所述载体为慢病毒载体。

[0259] 应理解,在本发明中,除了采用多个慢病毒进行转导,还可采用直接转染mRNA或质粒,或者通过表达人工转录因子等方法,从而在T细胞、TIL细胞等免疫细胞中联合表达IL-7和TGFβRII显性抑制突变体分子或靶向内源TGFβRII转录本的shRNA。

[0260] 制剂

[0261] 本发明提供了一种制剂,其含有本发明第一方面所述的工程化免疫细胞(如CAR-T细胞),以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。在一个实施方式中,所述制剂为液态制剂。优选地,所述制剂为注射剂。优选地,所述制剂中所述免疫细胞(如TIL细胞或CAR-T细胞)的浓度为 1×10^3 - 1×10^8 个细胞/ml,更优地 1×10^4 - 1×10^7 个细胞/ml。

[0262] 在一个实施方式中,所述制剂可包括缓冲液诸如中性缓冲盐水、硫酸盐缓冲盐水等等;碳水化合物诸如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇;蛋白质;多肽或氨基酸诸如甘氨酸;抗氧化剂;螯合剂诸如EDTA或谷胱甘肽;佐剂(例如,氢氧化铝);和防腐剂。本发明的制剂优选配制用于静脉内施用。

[0263] 治疗性应用

[0264] 本发明提供了利用含本发明表达盒的载体(如慢病毒载体)转导的细胞(例如,T细胞和TIL细胞等)进行的治疗性应用。经转导的T细胞或TIL细胞可靶向肿瘤细胞的表面标志物并表达IL-7与TGFBR11显性抑制突变体蛋白,从而协同而显著地提高其对肿瘤细胞的杀伤效率。

[0265] 因此,本发明也提供了刺激靶向哺乳动物肿瘤细胞群或组织的T细胞或TIL细胞所介导的免疫应答的方法,其包括以下步骤:给哺乳动物施用本发明的CAR-T细胞或施用本发明的增强型TIL细胞。

[0266] 在一个实施方式中,本发明提供了一类细胞疗法,其中,分离病人自体T细胞(或者异源供体),激活并进行基因改造产生CAR-T细胞,随后注入同一病人体内。这种方式使移植物抗宿主反应的发生概率极低,抗原被T细胞以无MHC限制方式识别。此外,CAR-T就可以治疗表达该抗原的多种不同癌症。不像抗体疗法,CAR-T细胞能够体内复制,产生可导致持续控制肿瘤的长期持久性。

[0267] 在一个实施方式中,本发明提供了一类细胞疗法,其中,分离病人自体TIL细胞(或者异源供体),激活并进行基因改造产生增强型TIL细胞,随后注入同一病人体内。这种方式使移植物抗宿主反应、细胞因子风暴、脱靶、肿瘤细胞免疫逃逸等风险的发生概率极低,肿瘤细胞被TIL细胞精确识别。不像抗体疗法,TIL细胞能够体内复制,产生可导致持续控制肿瘤的长期持久性。

[0268] 在一个实施方式中,本发明的CAR-T细胞或增强型TIL细胞可经历稳定的体内扩增并可持续数月至数年的时间。另外,CAR介导的免疫应答可为过继免疫疗法步骤的一部分,其中,CAR-T细胞可诱导对CAR抗原结合结构域所识别的抗原的高表达肿瘤细胞的特异性免疫应答。

[0269] 可治疗的癌症包括没有被血管化或基本上还没有被血管化的肿瘤,以及血管化的肿瘤。用本发明的CAR治疗的癌症类型包括但不限于:结直肠癌、乳腺癌、肝癌、胰腺癌、胃癌、食管癌、卵巢癌等。

[0270] 通常地,如本文所述活化和扩增的细胞可用于治疗和预防肿瘤等疾病。因此,本发明提供了治疗癌症的方法,其包括施用给需要其的对象治疗有效量的本发明的CAR-T细胞或增强型TIL细胞。

[0271] 本发明的CAR-T细胞和增强型TIL细胞可被单独施用,或作为药物组合物与稀释剂和/或其他组分诸如IL-2、IL-17、IL-7、IL-15、IL-21或其他细胞因子或细胞群结合施用。简单地说,本发明的药物组合物可包括如本文所述的靶细胞群,与一种或多种药学或生理学上可接受载体、稀释剂或赋形剂结合。

[0272] 本发明的药物组合物可以以适于待治疗(或预防)的疾病的方式施用。施用的数量和频率将由如患者的病症、和患者疾病的类型和严重度等因素确定,或可由临床试验确定。

[0273] 当指出“治疗有效量”、“抗肿瘤有效量”、“肿瘤-抑制有效量”或“治疗量”时,待施用的本发明组合物的精确量可由医师确定,其考虑患者(对象)的年龄、重量、肿瘤大小、感染或转移程度和病症的个体差异。包括本文描述的T细胞或增强型TIL细胞的药物组合物可以以 10^4 至 10^{11} 个细胞/kg体重的剂量,优选 10^5 至 10^8 个细胞/kg体重的剂量(包括范围内的所有整数)施用。T细胞组合物也可以以这些剂量多次施用。细胞可通过使用免疫疗法中公

知的注入技术(见例如Rosenberg等, New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988)施用。对于具体患者的最佳剂量和治疗方案可由医学领域技术人员通过监测患者的疾病迹象容易地确定,并以此调整治疗。

[0274] 对象组合物的施用可以以任何方便的方式进行,包括通过喷雾法、注射、吞咽、输液、植入或移植。本文描述的组合物可被皮下、皮内、瘤内、结内、脊髓内、肌肉内、通过静脉内注射或腹膜内施用给患者。在一个实施方式中,本发明的T细胞或增强型TIL细胞组合物通过皮内或皮下注射被施用给患者。在另一个实施方式中,本发明的T细胞或增强型TIL细胞组合物优选通过静脉内注射施用。T细胞或增强型TIL细胞的组合物可被直接注入肿瘤,淋巴结或感染位置。

[0275] 在本发明的某些实施方式中,利用本文描述的方法或本领域已知的其他将T细胞扩展至治疗性水平的方法活化和扩展的细胞,与任何数量的有关治疗形式结合(例如,之前、同时或之后)施用给患者,所述治疗形式包括但不限于用以下试剂进行治疗:所述试剂诸如抗病毒疗法、西多福韦和白细胞介素-2、阿糖胞苷(ARA-C)或对MS患者的那他珠单抗治疗或对牛皮癣患者的厄法珠单抗治疗或对PML患者的其他治疗。在进一步的实施方式中,本发明的T细胞或增强型TIL细胞可与以下结合使用:化疗、辐射、免疫抑制剂,诸如,环孢菌素、硫唑嘌呤、甲氨喋呤、麦考酚酯和FK506,抗体或其他免疫治疗剂。在进一步的实施方式中,本发明的细胞组合物与骨髓移植、利用化疗剂诸如氟达拉滨、外部光束放射疗法(XRT)、环磷酰胺结合(例如,之前、同时或之后)而施用给患者。例如,在一个实施方式中,对象可经历高剂量化疗的标准治疗,之后进行外周血干细胞移植。在一些实施方式中,在移植后,对象接受本发明的扩展的免疫细胞的注入。在一个额外的实施方式中,扩展的细胞在外科手术前或外科手术后施用。

[0276] 施用给患者的以上治疗的剂量将随着治疗病症的精确属性和治疗的接受者而变化。人施用的剂量比例可根据本领域接受的实践实施。通常,每次治疗或每个疗程,可将 1×10^5 个至 1×10^{12} 个本发明经修饰的T细胞或增强型TIL细胞,通过例如静脉回输的方式,施用于患者。

[0277] 本发明的主要优点

[0278] (1) 同时激活IL-7通路并抑制TGF β 通路的组合,可应用于多种不同免疫细胞,如应用于TIL、CAR-T、TCR-T、NK等免疫细胞。

[0279] (2) 本发明中激活IL-7通路并抑制TGF β 通路的改造,对TIL细胞功能提升的幅度出乎意料地高于其对T细胞功能提升的幅度。本发明的CAR-TIL细胞(或增强型TIL细胞)具有显著更高效的杀伤肿瘤细胞的能力。

[0280] (3) 出乎意料地,与健康供体的T细胞相比,当采用来自经放疗和/或化疗的患者的T细胞或TIL细胞(原本这些细胞常常因免疫能力下降或耗竭程度较高,而不适合用于制备工程化免疫细胞)来制备工程化免疫细胞时,本发明的激活IL-7通路并抑制TGF β 通路策略所带来的功能提升的幅度更高。

[0281] (4) 本发明的CAR免疫细胞在实体瘤治疗中的应用具有巨大潜力,特别是在治疗结肠直肠癌、卵巢癌、乳腺癌、肝癌、胰腺癌、胃癌、食管癌等。

[0282] (5) 与仅联合表达dnTGF β RII或TGF β RII-IL-7RA融合蛋白的CAR-T细胞相比,本发明可协同地进一步提高CAR-T细胞的增殖能力、IFN- γ 的释放水平以及对肿瘤的杀伤效果。

[0283] (6) 与联合表达IL-7和CCL19的CAR-T细胞相比,本发明的工程化免疫细胞可以在体内外提高CAR-T细胞对高表达TGF β 的肿瘤细胞杀伤效果,且意外地降低了毒副作用。

[0284] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明,而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如《分子克隆:实验室手册》(Sambrook等人,New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。

[0285] 除非另外说明,实施例中采用的试剂和材料为市售获得。

[0286] 材料与amp;方法

[0287] 辅助因子与CAR分子的结构设计

[0288] 各辅助因子的结构设计如图1所示。

[0289] (1) BW7TG由以下结构依次串联组成:IL-7、自剪切肽P2A(简称P2A)、TGF β RII显性抑制突变体(简称dnTGF β RII)。

[0290] (2) BW197-2由以下结构依次串联组成:IL-7、自剪切肽T2A(简称T2A)、CCL19、P2A、增强型绿色荧光蛋白白(简称eGFP)。

[0291] (3) BWTG由以下结构依次串联组成:dnTGF β RII。

[0292] 以CEA为靶点的CAR分子的结构设计如图2所示。

[0293] (1) BC001由以下结构依次串联组成:人CD8信号肽[简称CD8(SP)]、抗人CEA单链抗体(简称CEA scFv)、人CD8铰链区[简称CD8(hinge)]、人CD8跨膜结构域[简称CD8(TM)]、人4-1BB胞内共刺激结构域[简称4-1BB(ID)]、人CD3 ζ 胞内信号转导结构域[简称CD3 ζ (ID)]。

[0294] (2) BC010由以下结构依次串联组成:CD8(SP)、CEA scFv、CD8(hinge)、CD8(TM)、4-1BB(ID)、CD3 ζ (ID)、自剪切肽F2A(简称F2A)、IL-7、T2A、CCL19。

[0295] (3) BC011由以下结构依次串联组成:CD8(SP)、CEA scFv、CD8(hinge)、CD8(TM)、4-1BB(ID)、CD3 ζ (ID)、F2A、IL-7、P2A、dnTGF β RII。

[0296] 以CD133为靶点的CAR分子的结构设计如图3所示。

[0297] (1) BW133-2由以下结构依次串联组成:CD8(SP)、CD133 scFv、人IgG铰链区[简称IgG(Fc)]、CD8(TM)、4-1BB(ID)、CD3 ζ (ID)。

[0298] (2) BW133-12由以下结构依次串联组成:IL-7、T2A、CCL19、F2A、CD8(SP)、CD133 scFv、IgG(Fc)、CD8(TM)、4-1BB(ID)、CD3 ζ (ID)。

[0299] (3) BW133-13由以下结构依次串联组成:IL-7、P2A、dnTGF β RII、F2A、CD8(SP)、CD133 scFv、IgG(Fc)、CD8(TM)、4-1BB(ID)、CD3 ζ (ID)。

[0300] (4) BW133-11B由以下结构依次串联组成:CD8(SP)、CD133 scFv、IgG(Fc)、CD8(TM)、4-1BB(ID)、CD3 ζ (ID)、内部核糖体进入位点(简称IRES)、dnTGF β RII。

[0301] (5) BW133-6B由以下结构依次串联组成:CD8(SP)、CD133 scFv、IgG(Fc)、CD8(TM)、4-1BB(ID)、CD3 ζ (ID)、IRES、IL-7、T2A、CCL19。

[0302] (6) BW133-7B由以下结构依次串联组成:CD8(SP)、CD133 scFv、IgG(Fc)、CD8(TM)、4-1BB(ID)、CD3 ζ (ID)、IRES、IL-7、P2A、dnTGF β RII。

[0303] (7) BW133-7E由以下结构依次串联组成:CD8(SP)、CD133 scFv、IgG(Fc)、CD8(TM)、4-1BB(ID)、CD3 ζ (ID)、IRES、IL-7与dnTGF β RII的融合蛋白(简称IL-7:dnTGF β RII)。

[0304] 相关结构的氨基酸序列如下：

[0305] human IL-7 (SEQ ID No:1) :

[0306] MFHVSFRYIFGLPPLILVLLPVASSDCDIEGKDGKQYESVLMVMSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEG
MFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKLLNDLCFLKRLQ
EIKTCWNKILMGTKHEH

[0307] CD8 hinge 1 (SEQ ID No:2) :

[0308] FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEASRPAAGGAVHTRGLDFA

[0309] CD8 TM (SEQ ID No:3) :

[0310] CDIYIWAPLAGTCGVLLLLSLVITLYCNHRNR

[0311] P2A (SEQ ID No:4) :

[0312] ATNFSLLKQAGDVEENPGP

[0313] T2A (SEQ ID No:5) :

[0314] EGRGSLTTCGDVEENPGP

[0315] 4×GGGS (SEQ ID No:6) :

[0316] GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

[0317] IRES (SEQ ID No:7) :

[0318] GCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGT
TATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCTAGGGGT
CTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCTGTAAGGAAGCAGTTCCCTCGGAAGCTTCTTGAAGACAAAC
AACGTCTGTAGCGACCTTTGACGGCAGCGGAACCCACCTGGCGACAGGTGCCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAG
ATACACCTGCAAAGGGCGGCACAACCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGAAAGAGTCAAATGGCTCTCTCAAGC
GTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCAGAAAGGTACCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTACACATGCTTTAC
ATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGTC TAGGCCCCCGAACCCACGGGGACGTGGTTTTCTTTGAAAAACACGATGATAAT
ATGGCCACAACC

[0319] mIL-7 (SEQ ID No:8) :

[0320] MFHVSFRYIFGLPPLILVLLPVASSDCDIEGKDGKQYESVLMVMSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEG
MFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKLLNDLCFLKRLQ
EIKTCWNKILMGTKHEHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEASRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCG
VLLLSLVITLYCNHRN

[0321] TGFβRII 显性抑制突变体1 (SEQ ID No:9) :

[0322] MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICE
KPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKICMKEKKKPGETFFMCSRSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDLL
LVIFQVTGISLLPPLGVAISVIIIFYCYRVNRQKLS

[0323] TGFβRII mRNA (SEQ ID No:10) :

[0324] ACUCGCGCGCACGGAGCGACGACACCCCCGCGGUGCACCCGCGUCGGGACAGGAGCCGGACUCCUGUGCAGCUUC
CCUCGGCCGCGGGGGCCUCCCCGCGCCUCGCCGGCCUCCAGGCCCCUCCUGGUCGGCAGCGGGGCCACAUCUGGCC
CGCACAUUCGCGUCGCCGGCCCGCGCGGGGUCGGAGAGGGCGCGCGGAGGCGCAGCCAGGGGUCGGGAAGGCGC
CGUCCGUCGCGUCGGGGCUCGGUCUAUGACGAGCAGCGGGGUCUGCCAUUGGUCGGGGCUGCUCAGGGGCCUGUGCC
GCUGCACAUUCGUCUGGACGCGUAUCGCCAGCACGAUCCACCGCACGUUCAGAAGUCGGUUAUAACGACAUGAUAG
UCACUGACAACAACGGUGCAGUCAAGUUUCACAACUGUGUAAAAUUUGUGAUGUGAGAUUUUCCACCUGUGACAACAG
AAAUCUGCAUGAGCAACUGCAGCAUCCAUUCUGUGAGAAGCCACAGGAAGUCUGUGGGCUGUAUGGAGAAAGAA
UGACGAGAACAUAACACUAGAGACAGUUUGCAUGACCCCAAGCUCCCUACCAUGACUUUAUUCUGGAAGAUGCUGCUU
CUCCAAAGUGCAUUAUGAAGGAAAAAAAAGCCUGGUGAGACUUUCUUAUGUGUCCUGUAGCUCUGAUGAGUGCAAU

GACAACAUCAUCUUCUCAGAAGAAUAUAAACACCAGCAAUUCUGACUUGUUGCUAGUCAUUAUUCAAGUGACAGGCAUCAG
 CCUCCUGCCACCACUGGGAGUUGCCAUUAUCUGUCAUCAUCAUCUUCUACUGCUACCGCGUUAACCGGCAGCAGAAGCUGA
 GUUCAACUGGGAAACCGGCAGACGCGGAAGCUCUAGGAGUUCAGCGAGCAGUCUGGCAUCAUCCUGGAAGAUGACCGC
 UCUGACAUCAGCUCACGUGUGCCAACAACAUCAACCAACACAGAGCUGCUGCCAUUGAGCUGGACACCCUGGUGGG
 GAAAGGUCGCUUUGCUGAGGUCUAUAAGGCCAAGCUGAAGCAGAACACUUCAGAGCAGUUUGAGACAGUGGCAGUCAAGA
 UCUUUCUUAUGAGGAGUAUGCCUCUUGGAAGACAGAGAAGGACAUUCUCAGACAUCAAUCUGAAGCAUGAGAACAUA
 CUCCAGUUCUGACGGCUGAGGAGCGGAAGACGGAGUUGGGGAACAUAUACUGGCUGAUCACCGCCUCCACGCCAAGGG
 CAACCUACAGGAGUACUGACGCGGCAUGUCAUCAGCUGGGAGGACUGCGCAAGCUGGGCAGCUCCUCGCCCGGGGA
 UUGCUCACCUCACAGUGAUCACACUCCAUGUGGGAGGCCAAGAUGCCCAUCGUGCACAGGGACCUAAGAGCUCAAU
 AUCCUCGUGAAGAAGCACCUAACUGCUGCCUGUGUGACUUGGGCUUCCUGCGUCUGGACCUACUCUGUCUGUGGA
 UGACCUGGCUAACAGUGGGCAGGUGGGAACUGCAAGAUACUGGCUCAGAAAGUCUAGAAUCCAGGAUGAAUUUGGAGA
 AUGUUGAGUCCUUAAGCAGACCAGUUGUCUACUCCAUGGCUCUGGUGCUCUGGGAAUAGACAUCUCGUGUAUUGCAGUG
 GGAGAAGUAAAAGAUUAGAGCCUCAUUGGUUCCAAGGUGCGGGAGCACCUCUGUGUCGAAAGCAUGAAGGACAACGU
 GUUGAGAGAUCCAGGGCGACCAGAAAUCCAGCUCUCAGCCUACAGCCAGUGUGUGGCAAGAACGCUUCAGUGAGCUGGACUUGA
 CUGAGUCUGGGACACGACCAGAGGCCGUCUCACAGCCAGUGUGUGGCAAGAACGCUUCAGUGAGCUGGAGCAUCUG
 GACAGGCUCUCGGGGAGGAGCUCUCGGAGGAGAAGAUUCUGAAGACGGCUCUCAAACACUACCAAAUAGCUCUUCUG
 GGGCAGGCUGGGCAUGUCCAAAGAGGCUGCCUCUCACAAAGAACAGAGGCAGCAGGAAGCUGCCUCUGAACUGAUG
 CUUCCUGGAAAACCAAGGGGUCACUCCUCUCCUGUAAGCUGUGGGGAUAAAGCAGAAACAACAGCAGCAGGGAGUGGGU
 GACAUAGAGCAUUCUAGCCUUGACAUUGUCAUAGGAUAAGCUGUGUAGCACUCCUAGGAAUAGAGAUUAGUUUU
 ACAUAGCCAAUAACAUUUGCACUUAUUAUUGCCUGUAUUAUAAUUGAAUAGCUAUGUUUUAUUAUUAUUAUUAU
 UCUAUAUUAUGUCUAUAGCUCUAUUAUUAUAGCCAUACCUUGAAAAGAGACAAGGAAAAACAUAUUAUUCAGGAAU
 UGGUUUUAUUGGAGAACUCCAGAACCAGCAGAGAAGGAAGGGACCAUGACAGCAUUAUGCAUUAUACACACAUGC
 AGUGGUUCUCUGACUGUAAAACAGUGAUUUUGCAUAGGAGGAAAGAGGCUCUACUGUCACAGCCAGCUAUGACC AUUG
 CACUUGCUUUUGCAAAUUAUUAUUCUCCUGCUAGCACUUCUCUUCUGGCCAUGGAACUAAGUACAGUGGCACUGUUUGA
 GGACCAGUUGUCCGGGGUUCUGUGUGCCUUAUUUCUCUGGACUUUUAAGCUCUCCAGCCCAAUUCUGGGG
 GCUAGUUUAGAAACUCUCCUCAACCUAGUUUJAGAACUCUACCCAUUCUUAUACCUUGAAUUGUUUGAACCCACU
 UUUACCUCAUGGGUUGCAGAAAAUUCAGAACAGAUUGCCCAUCCAUUGCGAUUGCCCAACCAUCUACUAAUGAAAAU
 GUUCUUUUUUAUCUUCUCCUGCACUUAUGUUACUUAUCUCUGCUCUCCAGCCUUAUCUUCUUUUAUAAAAGGAGCAA
 UUCUCACUCUAGGCUUUAUCUGUUAUUCUUUUAUUAUACUUGACUUGAUUUUCUAGUUUUUAUACAACACCAAUGG
 GUUCCAUUUUCUGGGCUCUGAUUGCUCAAGCACAGUUUGCCUGAUGAAGAGGAUUUCAACUACACAUAUACUUAU
 GUCAGGACUUAUGACCUCAGGCACUCUAAAUAUUAUUAUUGUUUGGUCAGCACAGCGUUUCAAAGUGAAGCCACUUAU
 AAUAUUUGGAGAUUUUGCAGGAAAUCUGGAUCCAGGUAAGGAUAGCAGAUUGGUUUUCAGUUAUCUCAGUCCACGU
 UCACAAAUGUGAAGGUGUGGAGACACUUAACAAGCUGCCUCACUUCUCACUGUAACAUUAGCUCUUCACUGCCUAC
 CUGGACCCAGUCUAGGAUUAAAUCUGACCUAACCAAGGUCCUUGUAAGAAAUGUCCAUUCAAGCAGUCAUUCUCUG
 GGUUAUUAUUAUGAUUUUGACUACCUUAUCUGGUUUAAGAUUUUGAAGUUGGCCUUUUUAUUGGACUAAAGGGGAACUCC
 UUAAGGGUCUCAGUUAAGCCAAAGUUUCUUUGCUUAUUAUGUUAUUAUAGUUUAUACCUUCUGCAUUGGAGAGGGAGUGCUU
 ACUCCAAAGAAGCUUCUCUAGGUUACCGUUCUCUACUAGCCAGCCUUCUACCCAGAAAUUACUAGAGAGG
 AUUUGAAUGGGACACAAGGUCUCAAUUGCAGUUAGAAAUUUGUGUCCACAAGGACAAGAACAAGUAUAGAGCUUUA
 AAUCUCCAUAGGAAACUUGUUAUUAACAACAAGAAGUGUUAUUGCUGCAAGUAUCUCUUUUUUAUAAACUUUUUGAAGCUA
 CUUAUUUUCAGCCAAUAGGAAUUAUAGAGAGGGACUGGUAGUGAGAUAUACAGCUCUGUUUGGAGGUGGAAGGUCUCA
 UUUUAUUGAGAUUUUAAGAUACAUGCAAAGGUUUGGAAUJAGAACCUCUAGGCACCCUCCUAGUGUGGGUGGGCUGAG
 AGUUAAGACAGUGUGGCUGCAGUAGCAUAGAGGCGCCUAGAAAUCCACUUGCACCUGAAGGGCAUGCUGAUACCAUCC
 AAUAGCUGUUGCCAUUGACCUCUAGUGGUGAGUUUCUAGAUAUCUGGUCCAUAUAGAGAUUAUUAAGAUUAAGAGUA
 UUCUCACUUCUGGGUUAUCAGCAUAAACUGGAUUGUAGUGUCAGAGGAUACUGGGCUUGUUUUUGUUUAUGUUUUUUUU
 CUUUAUUAAGAAAAGACCAGGAUUAACAUCUGUAGUUCUAAAAUAUCUGACUUUUUACUACUUAUACAUAUAAAGG
 GAAAGUUUAUUCUUUAUUGGAACAUUCAGCUGUACUAGUAUUAUUAUAGGAUUGAAGCUUAUUAUCUUUUUUA
 UAUCAAAAGUCUACAAGCACUUAUUUUUAUUCUAGCAUUGUUUGCUUUUACUAAAUAUUAUUAUUAUUAUUAUUA
 AAGCAAAUACUCAGGUGAGCAUCCUGCCUCCUGUUCUCAAUCCUAGUAGCUAAA

[0325]

[0326] U6启动子核苷酸序列(SEQ ID No:11) :

GAGGGCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTGGAATTAAT
 TTGACTGTAAACACAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAA
 ATTAGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCCTAAGTATTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGA
 AAGGAC

[0327]

[0328] TGFβRII shRNA靶向范围核苷酸序列(SEQ ID No:12) :

[0329] AUCAACCACAACACAGAGCUGCUGCCCAUUGAGCUG

[0330] TGFβRII shRNA结合位点核苷酸序列1(SEQ ID No:13) :

[0331] AUCAACCACAACACAGAGC

[0332] TGFβRII shRNA结合位点核苷酸序列2(SEQ ID No:14) :

[0333] AGCUGCUGCCCAUUGAGCUG

[0334] TGFβRII shRNA结合位点核苷酸序列3(SEQ ID No:15) :

- [0335] UCGAAAGCAUGAAGGACAA
- [0336] TGFβRII shRNA结合位点核苷酸序列4(SEQ ID No:16):
- [0337] GGAGAAAGAAUGACGAGAACA
- [0338] TGFβRII shRNA结合位点核苷酸序列5(SEQ ID No:17):
- [0339] CCCUAAACACUACCAAUA
- [0340] TGFβRII shRNA表达框核苷酸序列1(SEQ ID No:18):
- [0341] GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAAATTGGAATTAATTTG
ACTGTAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAAGTAATAAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATG
TTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAA
ACACCGGTATCAACCAACACAGAGCTTCAAGAGAGCTCTGTGTTGTGTTGATTTTTT
- [0342] TGFβRII shRNA表达框核苷酸序列2(SEQ ID No:19):
- [0343] GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAAATTGGAATTAATTTG
ACTGTAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAAGTAATAAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATG
TTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAA
ACACCGGTAGCTGCTGCCATTGAGCTGTTCAAGAGACAGCTCAATGGGCAGCAGCTTTTTT
- [0344] TGFβRII shRNA表达框核苷酸序列3(SEQ ID No:20):
- [0345] GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAAATTGGAATTAATTTG
ACTGTAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAAGTAATAAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATG
TTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAA
ACACCGGTTGAAAGCATGAAGACAATTCAAGAGATTGCTCTTCATGCTTTTCGATTTTT
- [0346] TGFβRII shRNA表达框核苷酸序列4(SEQ ID No:21):
- [0347] GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAAATTGGAATTAATTTG
ACTGTAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAAGTAATAAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATG
TTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAA
ACACCGGTGGAGAAAGAAATGACGAGAACATTCAAGAGATGTTCTCGTCATTCTTCTCCTTTTT
- [0348] TGFβRII shRNA表达框核苷酸序列5(SEQ ID No:22):
- [0349] GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAAATTGGAATTAATTTG
ACTGTAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAAGTAATAAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATG
TTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAA
ACACCGGTCCCTAAACACTACCAAAATTTCAAGAGATATTTGGTAGTGTTAGGGTTTTT
- [0350] CD133(SEQ ID No:23):
- [0351] MALVLGSLLLLLGLCGNSFSGGQPSSTDAPKAWNYELPATNYETQDSHKAGPIGILFELVHIFLYVYVQPRDFPEDTLRK
FLQKAYESKIDYDKIVVYEAGIILCCVLGLLFIILMPLVGYFFCMCRCCNKCNGEMHQKQKENGPFRLKCFASLLVICIIIS
IGIFYGFVANHQVTRIKRSRKLADSNFKDLRLLNETPEQIKYILAQYNTTKDKAFTDLNSINSVLGGGILDRLRPNIIIPVL
DEIKSMATAIKETKEALENMNSTLKSLHQSTQLSSSLTSVKTSLSLNDPLCLVHPSSETCNSIRLSLSQLNSNPELRQLP
PVD AELDNVNNVLRDLDGLVQQGYQSLNDIPDRVQRQTTTAVAGIKRVLNSIGSDIDNVTRQLPQDILSAFVYVNNTESY
IHRNLPTLEEYDSYWWLGGVLICSLLLTIVIFYLGLLGVCGYDRHATPTTRGCVSNTGGVFLMVGVGLSFLFCWILMIIVV
LTFVFGANVEKLICEPYTSKELFRVLDTPYLLNEDWEYYSGLKFNKSKMKLTFEQVSDCKKNRGTYGTLHLQNSFNISEHL
NINEHTGSISSELES LKVNLFLLGAAGRKNLQDFAACGIDRMNYDSYLAQTGKSPAGVNL LSFAYDLEAKANSLPPGNLRN
SLKRDAQTIKTIHQQRVLP IEQSLSTLYQSVKILQRTGNGL LERVTRILASLDF AQNFITNNTSSVII EETKKGRTIIGYFE
HYLQWIEFSISEKVASCKPVATALD TAVDVFLCSYIIDPLNLFWFGIGKATVFLPALIFAVKLAKYRRMDESDVYDDVETI
PMKNMENGNGYHKDHVYGIHNPVMTSPSQH
- [0352] CEA(SEQ ID No:24):
- [0353] MESPSAPHRWCIPWQRLLLLTASLLTFWNPPTAKLTIESTPFNVAEGKEVLLLVHNLPHLFGYSWYKGERVDGNRQ
IIGYVIGTQQATPGPAYSGREIYPNASLLIQNIQNDTGFYTLHVIKSDLVNEEATGQFRVYPELPKPSISSNNSKPVEDKD
AVAFTEPETQDATYLWVNNQSLPVSRLQLSNGNRTLTLFNVTRNDTASYKCETQNPVSARRSDSVILNLVYGPAPTISP
LNTSYRSGENLNLSCHAASNPPAQYSWFVNGTFQOSTQELFIPNITVNNSGSYTCQAHNSDTGLNRTTVTITVYAEPPKPI
TSNNSNPVEDEDAVALTCEPEIQNTTYLWVNNQSLPVSRLQLSNGNRTLTLFNVTRNDVGPYECGIGNELSVDHSDPVILN
VLYGPDPTISPSYTYRPGVNL SLSCHAASNPPAQYSWLIDGNIQQHTQELFISNITEKNSGLYTCQANNSASGHSRTTVKT
ITVSAELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTEPEAQNTTYLWVNNQSLPVSRLQLSNGNRTLTLFNVTRNDARAYVCGIQNS
VSANRSDPVTLDVLYGPDTPIISSPPDSSYLSGANLNLSCHASNPSQYSWRINGIPQHTQVLFIAKITPNNGTYACFVSN
LATGRNNSIVKSITVSASGTSPLSAGATVGMIGVLVGVALT
- [0354] CD8 signal peptide(SEQ ID No:25):
- [0355] MALPVTALLLPLALLHAARPS

- [0356] IgG hinge (SEQ ID No:26) :
- [0357] ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0358] CD8 hinge 2 (SEQ ID No:27) :
- [0359] TTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEASRPAAGGAVHTRGLDFA
- [0360] 4-1BB共刺激结构域 (SEQ ID No:28) :
- [0361] KRGRKLLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL
- [0362] CD3 ζ 胞内结构域 (SEQ ID No:29) :
- [0363] RVKFSRSADAPAYQQGNQLYLNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG
ERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
- [0364] CD133 scFv-1 (SEQ ID No:30) :
- [0365] DVVVTQTPLSLPVSFQDQVSISSCRSSQSLANSYGNTYLSWYLHKPGQSPQLLIYGISNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTL
KISTIKPEDLGMYYCLQGTHQPYTFGGGTKLEIKRGGGGSGGGGSGGGGQVQLQQSGAELVLRPGASVKLSCKASGYTFSDFE
MHWVKQTPVHGLEWIGDIDPGTGDATAYNLKFKGKATLTDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVVYCTLGAFVYWGQGLTVTVSS
- [0366] CD133 scFv-2 (SEQ ID No.31) :
- [0367] DIVLSQSPAIMSASPGKEVTISCSASSSVSYMYWYQQKPGSSPKPWIYRTSNLASGVPARFSGSGSGTYSYSLTISSME
AEDAATYYCQYHSYPPTFGAGTKLELKS SGGGGSGGGGSSRSLEVKLVESGPELKKPGETVKISCKASGYTFDYSMHW
VNQAPGKGLKWMGWINTETGEPYADDFKGRFAFSLTSASTAYLQINNLKNETATYFCATDYGDYFDYWGQGLTVTVSS
- [0368] CEA scFv (SEQ ID No:32) :
- [0369] DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVGTSVAWYQQKPGKAPKLLIYWTSTRHTGVPSRFSGSGSGTDFFTISSL
QPEDIATYYCQYSLYRSFGGKTKVGIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGDFDFTYWMSWVRQA
PGKLEWVAEIHPPDSSTINYAPSLKDRFTISRDNKNTLFLQMSLRLPEDTGVYFCASLYFGFPWFAYWGQGLTVTVSS
- [0370] IL7:dnTGF β R1I (SEQ ID No:33) :
- [0371] MGMFHVSRFYIFGLPPLILVLLPVASSDCDIEGDKGQYESVLMVSIQDLDSMKEIGSNCLNNEFNFKRHICDANK
EGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTIILNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSL EENKSLKEQKLNLCFLKRL
LQEIKTCWNKILMGTKEHGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRSTCDNQKSC
MSNCSITSICEKQVEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKKEKKKPGETFFMCSGSSDECDNIIIFS
EEYNTSNPDLILLVIFQVTGISLLPPLGVAISVIIIFCYRVNRQQLSS
- [0372] TGF β R1I显性抑制突变体2 (SEQ ID No:34) :
- [0373] TIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCSITSICEKQVEVCVAVWRKNDENITLETV
CHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKKEKKKPGETFFMCSGSSDECDNIIIFSEYNTSNPDLILLVIFQVTGISLLPPLGVAISVI
IIFCYRVNRQQLSS
- [0374] ODD (SEQ ID:35) :
- [0375] APAAGDTIISLDFGSNDTETDDQQL EEVPLYNVMLPSPNEKLNINLAMSPLPTAETPKPLRSSADPALNQEVALKL
EPNPESLELSFTMPQIQDQTPSPSDGSTRQSSPEPNPSEYCFYVSDMVNEFKLELVEKLF AEDTEAKNPFSTQDLDLDEM
LAPYIPMDDDFQLRSFDQLSPLESSSASPESASPSTVTVFQ
- [0376] 实施例1慢病毒载体的制备
- [0377] 分别将上述各目的基因片段构建于慢病毒表达载体pCDH-EF1 α -MCS中,再将各载体质粒分别与慢病毒包装质粒pMDLg-pRRE、pRSV-Rev和pMD2.G混合,并按说明书用Lipofectamine 3000试剂转染至293T细胞中。转染后6h更换为完全培养基。
- [0378] 分别收集转染后48h和72h的病毒上清液,获得病毒浓缩液,分别命名为BW7TG、BW197-2、BWTG、BC001、BC010、BC011、BW133-2、BW133-12、BW133-13、BW133-11B、BW133-6B、BW133-7B、BW133-7E。将收集的病毒浓缩液置于-80℃保存。
- [0379] 最后,以Jurkat细胞为材料,对上述慢病毒进行活性滴度检测。
- [0380] 实施例2增强型TIL细胞的制备和检测
- [0381] (1) 增强型TIL细胞的制备

[0382] 将肿瘤组织经消化处理后获得的单细胞悬液在含有抗人CD3抗体和IL-2的培养基中培养,直至TIL细胞进入对数生长期。以MOI=10IU/ml的用量,分别加入上述慢病毒载体,感染后72h更换为X-VIVO 15完全培养基。获得的增强型TIL细胞沿用慢病毒的名称,分别命名为BW7TG TIL、BW197-2 TIL、BWTG TIL,未转导慢病毒的T细胞命名为Ctrl TIL。

[0383] (2) 增强型TIL细胞的转导效率和IL-7表达检测

[0384] 用PBS清洗待检测的细胞两次,并用FACS缓冲液重悬。按照抗体说明书将BV421标记的抗人CD3抗体和APC标记的抗人TGF β R II抗体加入待检测细胞悬液中,4 $^{\circ}$ C孵育60min,以未用慢病毒转染的TIL细胞为阴性对照,用流式细胞仪检测TIL细胞的dnTGF β R II和eGFP表达率,以表征转导效率。采用FlowJo软件分析。

[0385] 结果如图4所示,BW7TG在TIL细胞中的表达率为67.0%,BWTG在TIL细胞中的表达率为51.7%,BW197-2在TIL中的表达率为30.8%,说明dnTGF β R II在TIL细胞中能有效表达。

[0386] 用X-VIVO 15培养基分别调整待测TIL细胞至 1×10^5 个/孔。培养96h后,离心并吸取上述共培养的细胞上清,用含1%BSA的PBS稀释样本。同时用ddH₂O溶解IL-7标准品,将标准品按推荐梯度倍比稀释。分别将标准品和实验样品加入包被有IL-7捕获抗体反应孔中,每孔100 μ l。室温孵育1~3h后,配制1 \times 清洗液,每孔用300 μ l清洗液清洗3次。将孔中液体拍干后,每孔加入100 μ l酶标IL-7检测抗体,室温孵育1~3h。每孔用300 μ l清洗液清洗3次。将孔中液体拍干后,加入100 μ l显色底物。室温避光孵育20min后,每孔加入50 μ l终止液,用酶标仪测定450nm的吸光值并计算IL-7的浓度。

[0387] 结果如图5所示,Ctrl TIL的IL-7分泌水平为 0.8 ± 0.2 pg/ml,BW7TG TIL为 8604.6 ± 1003.8 pg/ml,BWTG为 1.4 ± 0.1 pg/ml,BW197-2为 1486.2 ± 242.3 pg/ml,说明IL-7在TIL细胞中能有效表达和分泌。

[0388] 实施例3CAR-T细胞的制备和检测

[0389] (1) CAR-T细胞的制备

[0390] 将健康供者的外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell,PBMC)复苏于AIM V培养基中,并用抗人CD3/CD28抗体刺激培养T细胞。以MOI=5IU/ml的用量,分别用慢病毒转导上述细胞。转导后第7天,检测相应CAR分子的表达,转导后第10天收取细胞,液氮保存备用。获得的CAR-T细胞沿用慢病毒的名称,分别命名为BC001、BC010、BC011、BW133-2、BW133-12、BW133-13、BW133-11B、BW133-6B、BW133-7B、BW133-7E,未转导慢病毒的T细胞命名为Ctrl T。

[0391] (2) CEA CAR-T细胞中CAR分子、dnTGF β R II和IL-7的表达检测

[0392] 用PBS清洗待检测的Ctrl T、BC001、BC010和BC011细胞两次,并用FACS缓冲液重悬。按照抗体说明书将PE标记的CEA蛋白、BV421标记的抗人CD3抗体加入待检测细胞悬液中,4 $^{\circ}$ C孵育60min。用流式细胞仪检测Ctrl T、BC001、BC010和BC011细胞的CEA CAR分子的表达率。

[0393] 结果如图6所示,BC001、BC010和BC011细胞CAR分子的表达率分别为80.8%、88.1%和86.5%。

[0394] 用PBS清洗待检测的Ctrl T和BC011细胞两次,并用FACS缓冲液重悬。按照抗体说明书将BV421标记的抗人CD3抗体以及APC标记的抗人TGF β R II抗体加入待检测细胞悬液中,4 $^{\circ}$ C孵育60min,以未用慢病毒转染的Ctrl T细胞为阴性对照,用流式细胞仪检测Ctrl T和

BC011细胞的dnTGFβRII表达率。采用FlowJo软件分析。

[0395] 结果如图7所示,BC011细胞的dnTGFβRII表达率为34.2%,表明BC011细胞成功的表达dnTGFβRII分子。

[0396] 用AIM V培养基分别调整待测T细胞至 1×10^5 个/孔。培养96h后,离心并吸取上述共培养的细胞上清,用含1%BSA的PBS稀释样本。同时用ddH₂O溶解IL-7标准品,将标准品按推荐梯度倍比稀释。分别将标准品和实验样品加入包被有IL-7捕获抗体反应孔中,每孔100 μl。室温孵育1~3h后,配制1×清洗液,每孔用300 μl清洗液清洗3次。将孔中液体拍干后,每孔加入100 μl酶标IL-7检测抗体,室温孵育1~3h。每孔用300 μl清洗液清洗3次。将孔中液体拍干后,加入100 μl显色底物。室温避光孵育20min后,每孔加入50 μl终止液,用酶标仪测定450nm的吸光值并计算IL-7的浓度。

[0397] 结果如图8所示,Ctrl T和BC001细胞的IL-7分泌水平为 0.0 ± 0.0 pg/ml和 0.4 ± 0.0 pg/ml。与之相比,BC010和BC011细胞的IL-7分泌水平为 301.5 ± 46.9 pg/ml和 502.4 ± 121.3 pg/ml,说明四代CAR结构都能有效分泌IL-7。

[0398] (3) CD133 CAR-T细胞中CAR分子、dnTGFβRII和IL-7的表达检测

[0399] 按上述方法检测Ctrl T、BW133-2、BW133-12、BW133-13、BW133-11B、BW133-6B、BW133-7B、BW133-7E细胞中CD133 CAR分子、dnTGFβRII和IL-7的表达情况。

[0400] CD133 CAR分子的表达率如图9所示,BW133-2、BW133-12、BW133-13、BW133-11B、BW133-6B、BW133-7B、BW133-7E细胞的CAR分子表达率分别为78.7%、57.2%、42.4%、74.9%、67.7%、61.8%和70.0%,表明CAR分子成功表达。dnTGFβRII的表达率如图10所示,BW133-13、BW133-11B、BW133-7B、BW133-7E细胞的dnTGFβRII表达率为44.0%、44.1%、30.0%和28.2%,表明dnTGFβRII分子在这些四代CAR中都表达成功。

[0401] IL-7的表达水平如图11A所示,Ctrl T、BW133-2、BW133-12、BW133-13、BW133-6B、BW133-7B的IL-7分泌水平分别为 6.0 ± 0.9 pg/ml、 6.6 ± 0.2 pg/ml、 7338.6 ± 166.3 pg/ml和 5244.9 ± 271.8 pg/ml。膜结合型IL-7的表达水平如图11B所示,BW133-7E中膜结合型的IL-7表达率为17.3%,说明IL-7在这些四代CAR结构中都能成功表达。

[0402] 实施例4靶细胞检测

[0403] (1) 靶细胞的培养条件

[0404] 本实施例中使用的肿瘤细胞均为表达mCherry荧光蛋白的报告细胞系:结直肠癌细胞HT55-Luc-mCherry (DMEM培养基+10%胎牛血清+100U/ml青霉素+100 μg/ml链霉素)、SW620-Luc-mCherry (Leibovitz L-15培养基+10%胎牛血清+100U/ml青霉素+100 μg/ml链霉素)、HCT116-TGFβ-Luc-mCherry和HT29-TGFβ-Luc-mCherry (McCoy's 5A培养基+10%胎牛血清+100U/ml青霉素+100 μg/ml链霉素);胃癌细胞HGC-27-Luc-mCherry、胰腺癌Capan-2-Luc-mCherry (McCoy's 5A培养基+10%胎牛血清+100U/ml青霉素+100 μg/ml链霉素)以及肝癌细胞SK-Hep1-Luc-mCherry (EMEM培养基+10%胎牛血清+100U/ml青霉素+100 μg/ml链霉素)。

[0405] (2) 靶细胞的CEA表达检测

[0406] 用PBS清洗待检测细胞两次,并用FACS缓冲液重悬。按照抗体说明书将AF700标记的抗CEA抗体加入待检测细胞悬液中,4℃孵育60min。以加入相应Isotype抗体孵育的靶细胞作为阴性对照,用流式细胞仪检测靶细胞的CEA表达率。

[0407] 用PBS清洗待检测细胞两次,并用FACS缓冲液重悬。按照抗体说明书将PE-Cy7标记的抗CD133抗体加入待检测细胞悬液中,4℃孵育60min。以加入相应Isotype抗体孵育的靶细胞作为阴性对照,用流式细胞仪检测靶细胞的CD133表达率。采用FlowJo软件分析,结果如表1所示。

[0408] 表1肿瘤细胞中CEA和CD133的表达率

	靶细胞	CEA 表达率	CD133 表达率
[0409]	HT55-Luc-mCherry	99.22%	37.2%
	SW620-Luc-mCherry	11.83%	88.95%
	HGC-27-Luc-mCherry	/	72.1%
[0410]	Capan-2-Luc-mCherry	/	94%
	HCT116-Luc-mCherry	0%	95.3%
	HT29-Luc-mCherry	5.66%	100%

[0411] 实施例5增强型TIL细胞功能研究

[0412] (1) 增强型TIL细胞杀伤效果检测

[0413] 用SK-Hep1-Luc-mCherry进行增强型TIL细胞的杀伤效果检测。消化靶细胞并计数,以 1×10^4 /孔的密度将靶细胞接种于96孔板,根据实验需求加入 1×10^4 /孔或 2×10^4 /孔的TIL细胞进行共培养。另一方面为考察dnTGFBR II 功能,在共培养体系中加入10ng/ml的TGF β ,用IncuCyte活细胞分析仪检测靶细胞面积随时间的变化情况。靶细胞面积越小,说明靶细胞的死亡程度越高,T细胞杀伤效果越好。

[0414] 结果如图12所示。BW197-2 TIL、BWTG TIL、BW7TG TIL组的杀伤效果都显著优于Ctrl TIL对照组。随着靶细胞刺激的次数增加,BW197-2的杀伤效果显著减弱。在与靶细胞共培养第11天时,BWTG TIL和BW7TG TIL细胞仍保持较强的杀伤效果,但BW7TG TIL的杀伤效果显著强于其他各组别($P < 0.05$) (图12)。这表明,同时激活IL-7通路并抑制TGF β 通路,可以意外地显著提升TIL细胞抵抗肿瘤微环境免疫抑制的能力,同时进一步增强其对肿瘤细胞的杀伤效果。

[0415] (2) 增强型TIL细胞的IFN- γ 释放水平

[0416] 用培养基分别调整效应细胞和靶细胞的浓度并按1:1的比例接种于96孔板,使总细胞数为 1×10^5 /孔(即效应细胞和靶细胞细胞数分别为 0.5×10^5 /孔)。随后加入10ng/ml的TGF- β 1,每组三个重复,放入37℃,5%CO₂培养箱中共培养。72h后,收集培养上清液,用ELISA法检测上清中IFN- γ 的浓度。

[0417] 结果如图13所示。Ctrl TIL、BW197-2 TIL、BWTG TIL、BW7TG TIL的IFN- γ 释放水平分别为 8417.8 ± 1004.7 pg/ml、 10712.3 ± 1521.3 pg/ml、 37561.7 ± 3846.0 pg/ml和 52859.2 ± 4101.4 pg/ml,BW7TG TIL的IFN- γ 释放水平显著高于其他组别($P < 0.05$)。这表明,联合表达IL-7和dnTGFBR II可以协同地提高TIL细胞在TGF β 浓度较高的肿瘤微环境中的激活水平。

[0418] 实施例6CAR-T细胞的功能研究

[0419] (1) CEA CAR-T细胞杀伤效果检测

[0420] 根据上述靶点抗原的流式检测结果,选用HT55-Luc-mCherry进行CAR-T细胞的杀伤效果检测。消化靶细胞并计数,以 1×10^4 /孔的密度将靶细胞接种于96孔板,根据实验需求加入 1×10^4 /孔或 2×10^4 /孔的T细胞进行共培养。另一方面,为考察dnTGF β R II功能,在共培养体系中加入10ng/ml的TGF β ,用IncuCyte活细胞分析仪检测靶细胞面积随时间的变化情况。靶细胞面积越小,说明靶细胞的死亡程度越高,T细胞杀伤效果越好。

[0421] 结果如图14所示。虽然BC001和BC010对靶细胞有一定的杀伤能力,但在共培养第5天靶细胞的面积仍有明显增长,说明BC001和BC010的杀伤效果受到TGF β 的抑制。相反,表达IL-7和dnTGF β R II的CAR-T细胞BC011能有效且持续的抑制靶细胞的生长,杀伤效果显著强于其他各组别($P < 0.05$)。这说明联合表达IL-7和dnTGF β R II能有效抵抗TGF β 对T细胞的抑制作用,增强CAR-T细胞对肿瘤的杀伤能力。

[0422] (2) CD133 CAR-T细胞杀伤效果检测

[0423] 根据上述靶点抗原的流式检测结果,选用HCT116-Luc-mCherry进行CAR-T细胞的杀伤效果检测。消化靶细胞并计数,以 1×10^4 /孔的密度将靶细胞接种于96孔板,根据实验需求加入 1×10^4 /孔或 2×10^4 /孔的T细胞进行共培养。另一方面,为考察dnTGF β R II功能,在共培养体系中加入10ng/ml的TGF β ,用IncuCyte活细胞分析仪进行长时间杀伤效果检测。

[0424] 结果如图15所示。与CEA CAR-T细胞的结果相似,BW133-13组对肿瘤细胞的杀伤效果显著强于其他各组别($P < 0.05$)。这一结果说明,联合表达IL-7和dnTGF β R II能有效抵抗TGF β 对T细胞的抑制作用,增强CAR-T对肿瘤的杀伤能力。

[0425] (3) 体内抑瘤实验。

[0426] 用胰酶消化法收集处于对数生长期且生长状态良好的靶细胞SW620,用生理盐水洗涤1次后,调整细胞密度为 3×10^7 /ml。在B-NDG小鼠右侧靠近腋下部位皮下注射100 μ l细胞悬液,即每只小鼠接种 3×10^6 的靶细胞,当肿瘤平均体积为50~100mm³时,通过尾静脉分别注射CAR-T细胞(1×10^7 /只)和Ctrl T细胞(1×10^7 /只),注射受试物当天记为治疗的第0天,每周测量肿瘤大小。

[0427] 结果如图16所示。在SW620皮下瘤模型中,CAR-T细胞回输第25天后,联合表达IL-7和dnTGF β R II的BW133-13组的肿瘤体积为 654.3 ± 255.8 mm³,显著小于BW133-2对照组(肿瘤体积为 1503.2 ± 365.4 mm³) ($P < 0.05$)。虽然在注射CAR-T细胞后的第14天,联合表达IL-7和CCL19的BW133-12组的肿瘤体积已有缩小的趋势,但之后小鼠出现明显的副反应并死亡,说明该CAR-T细胞存在一定的安全风险。

[0428] 上述结果表明,在激活IL-7通路的同时抑制TGF β 的信号通路,不仅可以在保持IL-7对T细胞增强作用的同时,还意外地显著降低在体内的毒副作用,比现有的联合表达IL-7和CCL19技术的安全性更好。

[0429] 实施例7CAR-T细胞适应症研究

[0430] (1) 联合表达IL-7和dnTGF β R II的CAR-T细胞对多种实体瘤细胞的杀伤效果检测

[0431] 为了进一步提升IL-7和dnTGF β R II的CAR-T细胞的安全性,将IL-7与dnTGF β R II融合表达,使IL-7通过dnTGF β R II锚定在T细胞的膜上,获得BW133-7E细胞。同时,为了研究联合表达IL-7和dnTGF β R II的CAR-T细胞是否也适用于治疗结直肠癌以外的恶性实体瘤。用HCT116-TGF β -Luc-mCherry、HT-29-Luc-mCherry、HGC-27-Luc-mCherry、Capan-2-Luc-mCherry细胞进行CAR-T细胞的杀伤效果检测。消化靶细胞并计数,以 1×10^4 /孔的密度将靶

细胞接种于96孔板,根据实验需求加入 1×10^4 /孔或 2×10^4 /孔的CAR-T细胞(BW133-2、BW133-6B、BW133-11B、BW133-7E)进行共培养。在共培养体系中加入TGF β 后,用Incucyte活细胞分析仪进行长时间杀伤效果检测。

[0432] 结果如图17所示。各实验组的杀伤效果都显著优于Ctrl T对照组。随着靶细胞刺激的次数增加,表达IL-7和dnTGF β RII融合蛋白的CAR-T细胞,对HCT116-Luc-mCherry结肠癌细胞(图17A)、HT-29-Luc-mCherry结肠癌细胞(图17B)、Capan-2-Luc-mCherry胰腺癌细胞(图17C)和HGC-27-Luc-mCherry胃癌细胞(图17D)的杀伤效果显著强于其他组别($P < 0.05$)。

[0433] 以不同的起始细胞密度将Ctrl T、BW133-2和BW133-7E细胞至于96孔板中培养,72h后进行AO/PI染色并统计活细胞数目。

[0434] 当起始细胞密度为 1×10^5 /ml至 2×10^5 /ml时,BW133-7E组的细胞扩增倍数与BW133-2组没有显著差异(图18A和图18B)。当起始细胞密度为 5×10^5 /ml时,BW133-2组的扩增倍数为 1.48 ± 0.13 倍,BW133-7E组的扩增倍数为 2.08 ± 0.19 倍,显著高于BW133-2组($P < 0.05$,图18C)。以上结果说明,表达IL-7和dnTGF β RII融合蛋白的CAR-T细胞的细胞增殖能力可以根据细胞密度进行自我调控。当聚集于肿瘤病灶时,细胞增殖能力可以显著提升,而在非肿瘤部位则不会不受控地增殖。

[0435] 讨论

[0436] 对于实体瘤的治疗,目前的免疫细胞疗法存在多种缺点。例如,传统的二代CAR-T细胞在体内的存活时间较短,扩增能力较弱。在二代CAR-T细胞的基础上联合表达IL-7,可以有效促进T细胞的增殖、存活、免疫记忆能力。研究表明,进一步联合表达IL-7和趋化因子CCL19或CCL21,虽然可以促进CAR-T细胞向肿瘤部位浸润和存活,但仍未能有效解决实体瘤中免疫抑制性的微环境对免疫细胞的抑制作用。

[0437] 一方面,在免疫细胞中敲降或敲除TGF β 的受体,或过表达TGF β 受体的显性抑制突变体(如dnTGF β RII),都可以有效阻断细胞内源的TGF β 信号通路,降低TGF β 对免疫细胞产生的抑制作用,从而保持免疫细胞在肿瘤微环境中的活性。然而,虽然这些技术能一定程度上提高T细胞的在肿瘤微环境中的杀伤效果,但并不能保持CAR-T细胞在体内的记忆和存续能力。

[0438] 另一方面,为了解决肿瘤微环境的抑制作用和工程化免疫细胞在体内存续时间短、记忆能力差等问题,有研究在CD19 CAR-T的基础上联合表达由TGF β RII胞外域和IL-7RA胞内域组成的融合蛋白,以将TGF β 的抑制信号逆转为IL-7的激活信号。然而,完整的IL-7激活信号需要IL-2RG和IL-7RA形成复合体并共同传导。因此,所述融合蛋白仅能通过IL-7RA胞内域进行信号转导,激活程度是不完整的。此外,由于该技术需要TGF β 的存在才能激活免疫细胞的IL-7通路。因此,在当免疫细胞所处的环境中TGF β 浓度较低,便难以通过IL-7通路维持自身的存续。

[0439] 在本发明中,通过上调IL-7并同时下调TGF β 通路,提高工程化免疫细胞的IL-7信号的激活程度和显著提供对肿瘤微环境的抵抗能力,从而显著而协同地提高免疫细胞地IFN- γ 释放水平并增强对肿瘤细胞的杀伤效果,进而协同提高工程化免疫细胞的疗效。实验表明,本发明的工程化免疫细胞(以CAR-T细胞或TIL为例)具有显著提高的免疫细胞的增殖能力、显著减少的衰竭、显著增强对免疫抑制环境的抵抗力。在本发明中,还通过优化的

IL-7和dnTGFβRII的结构,意外地降低了IL-7过量表达而造成的毒副作用的风险。

[0440] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外,应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

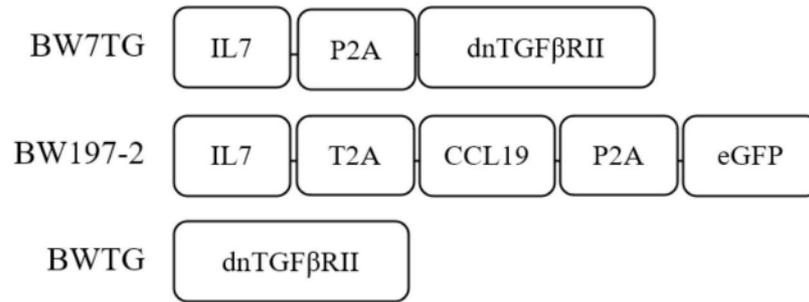


图1

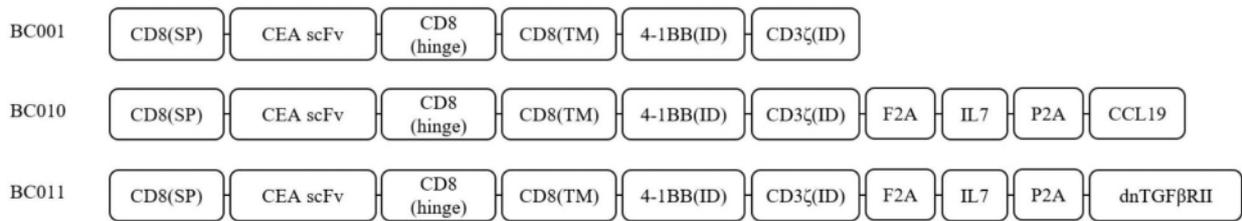


图2

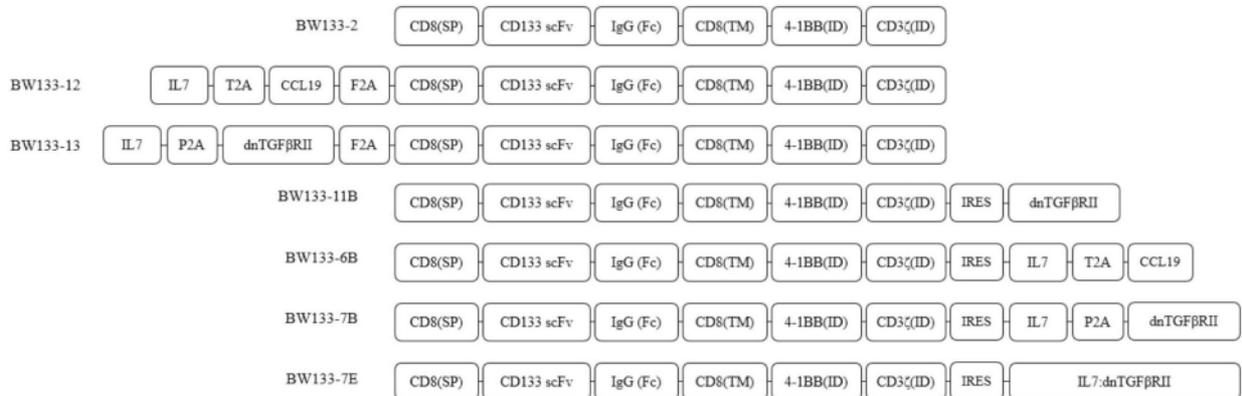


图3

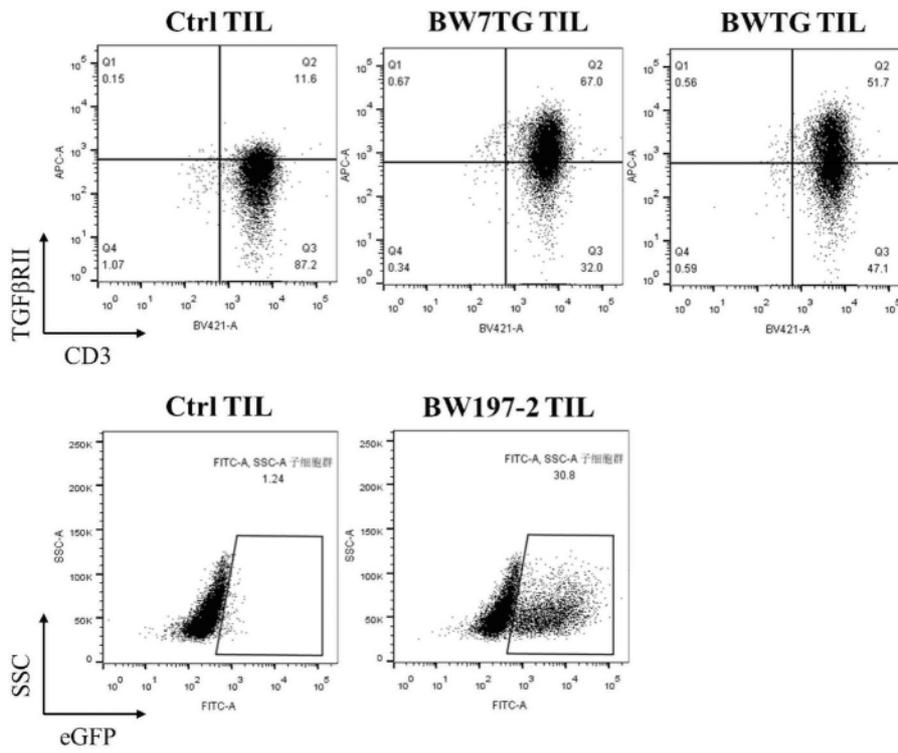


图4

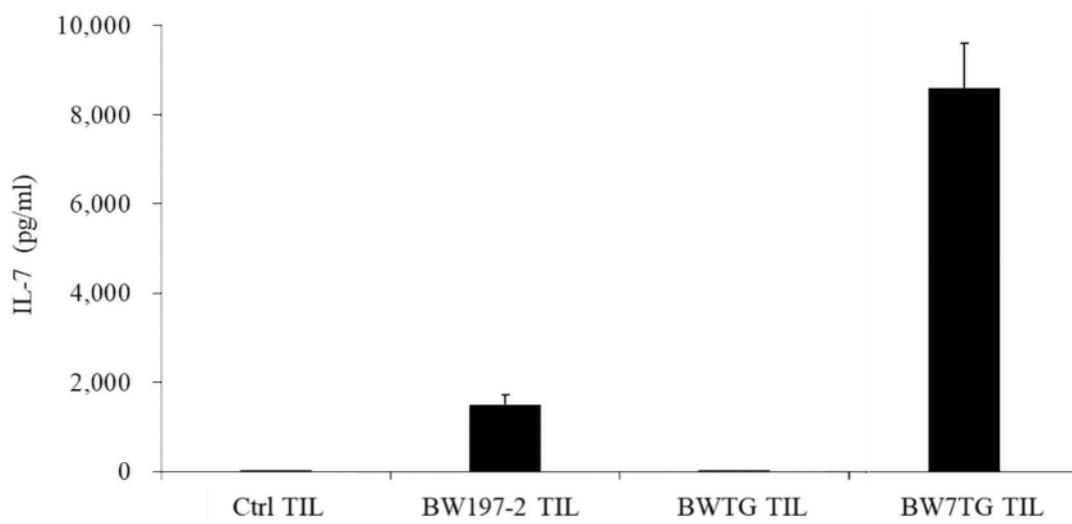


图5

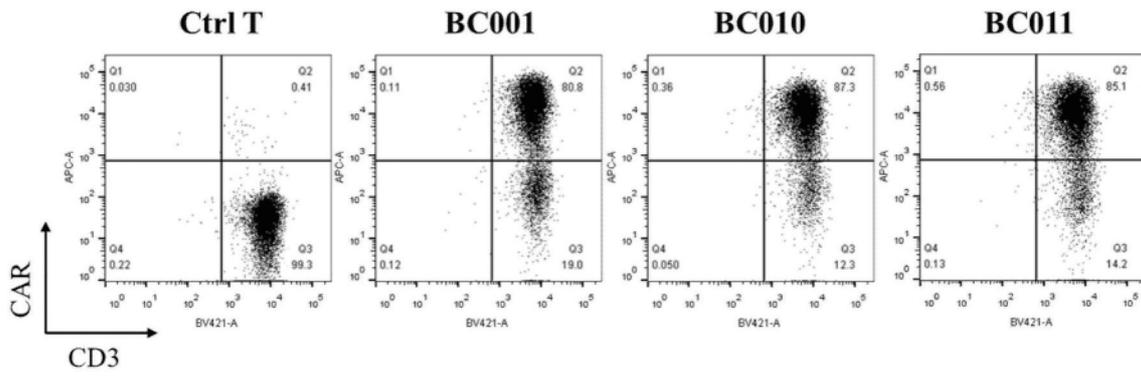


图6

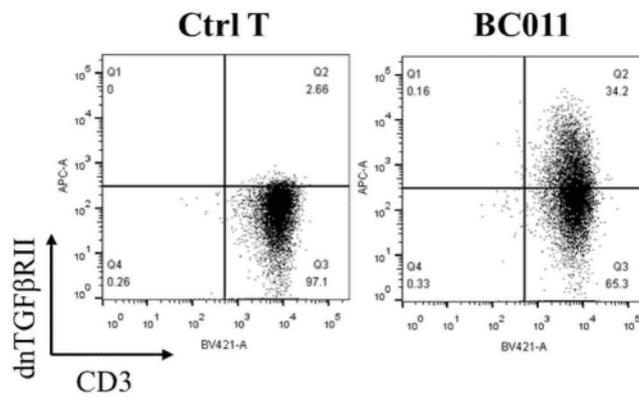


图7

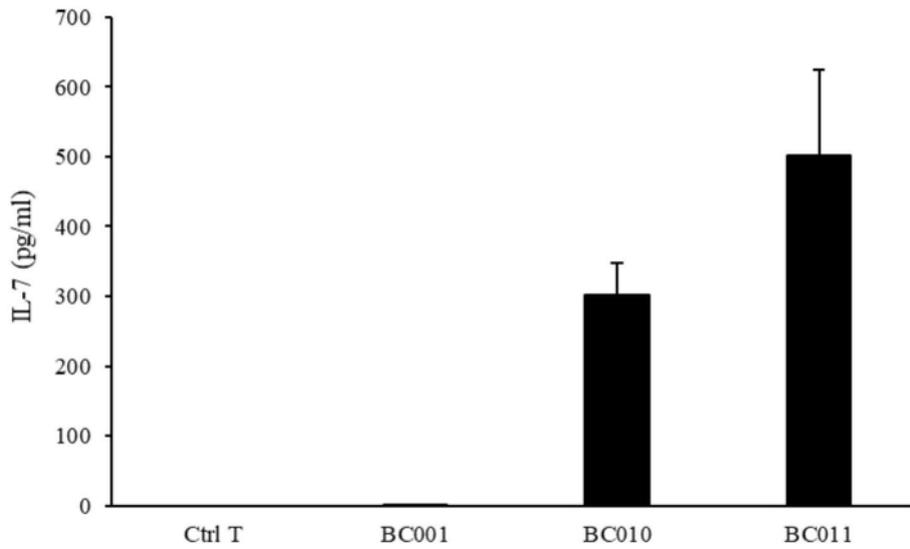


图8

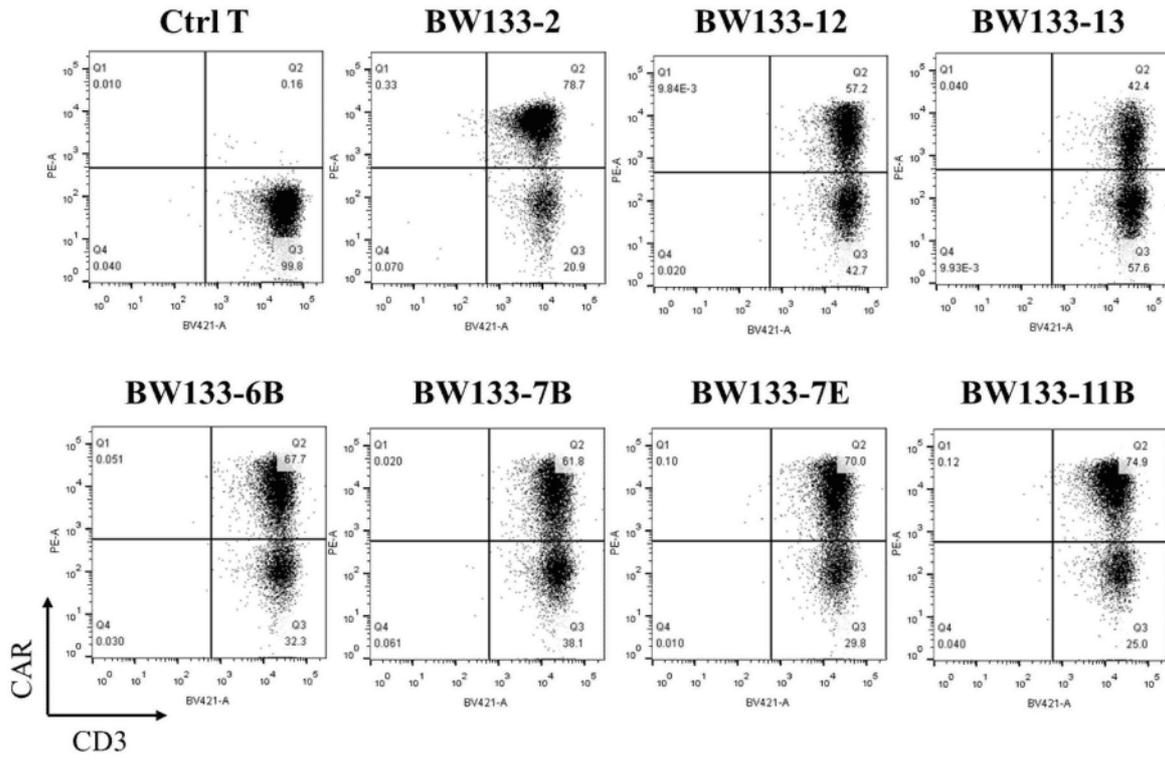


图9

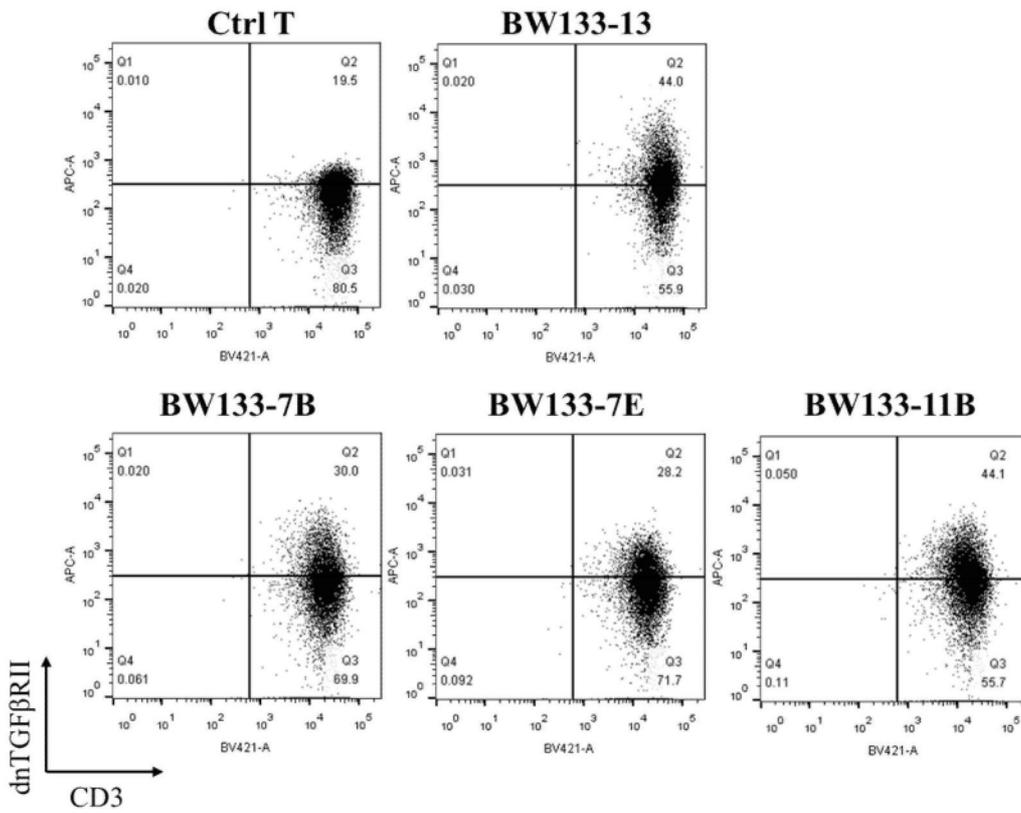


图10

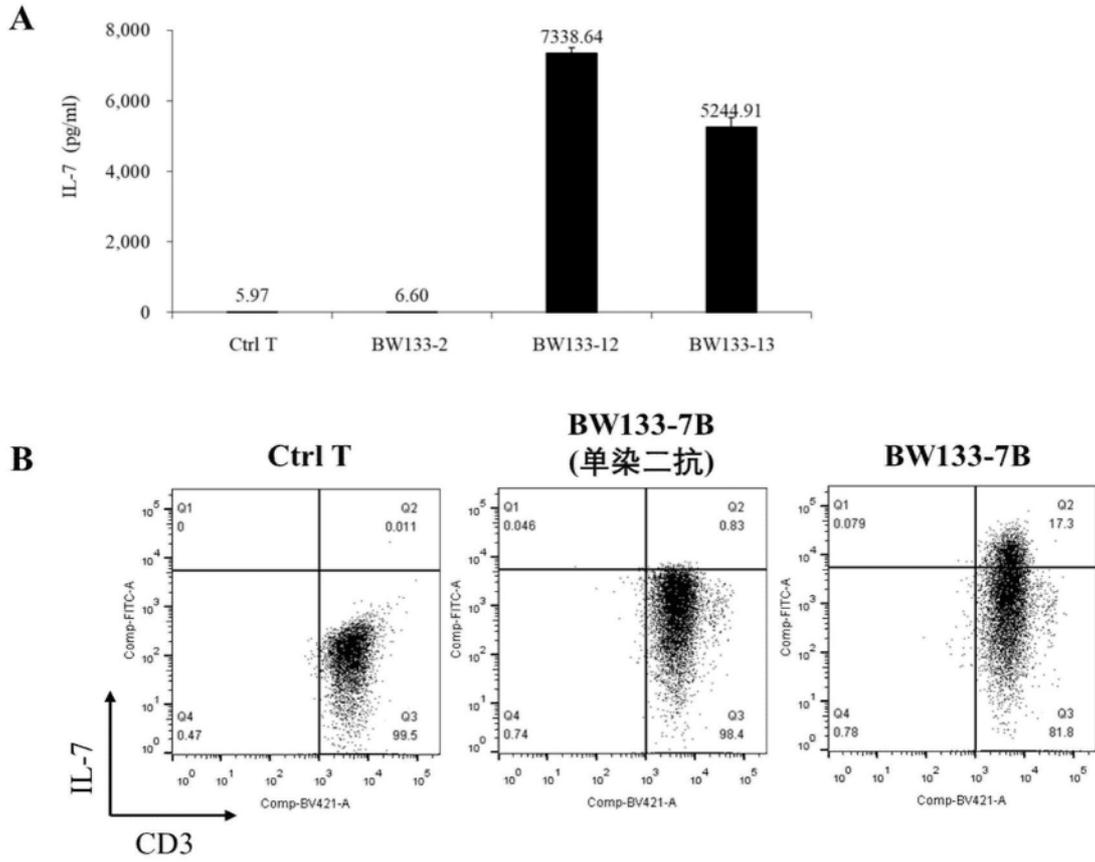


图11

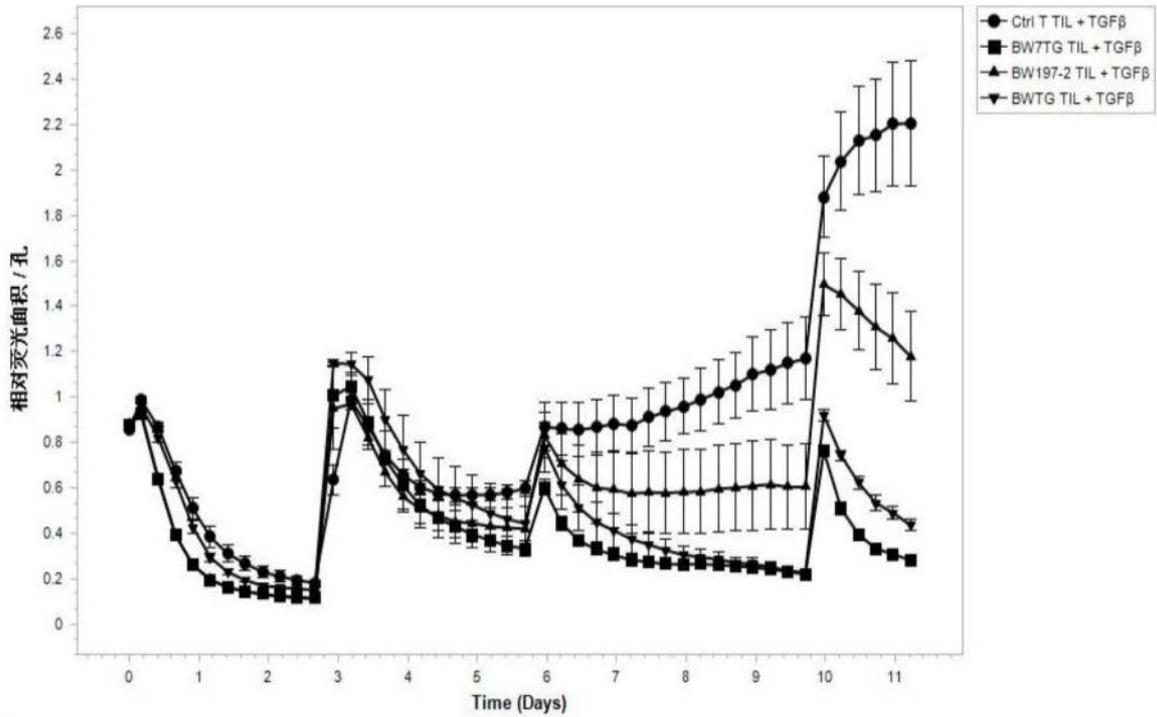


图12

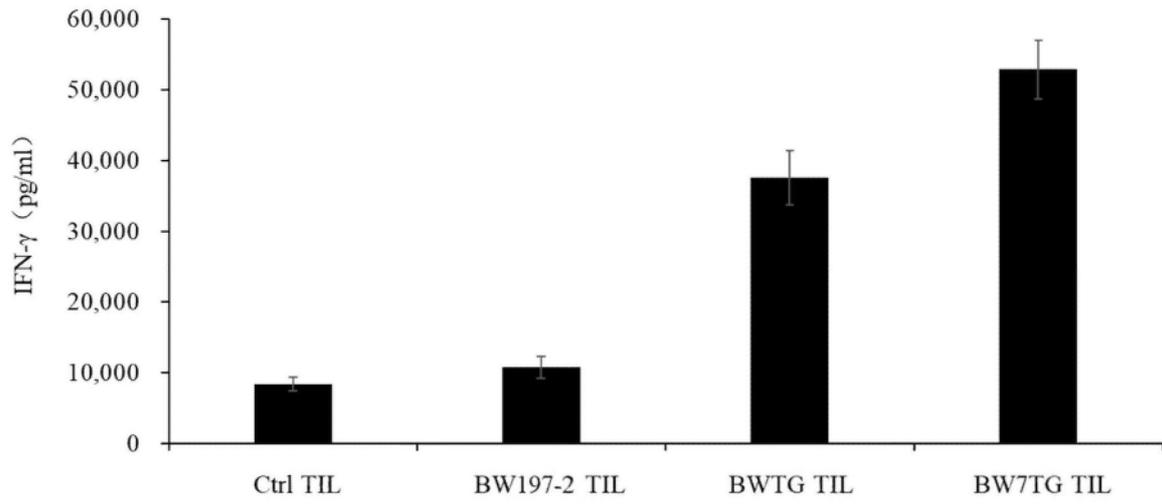


图13

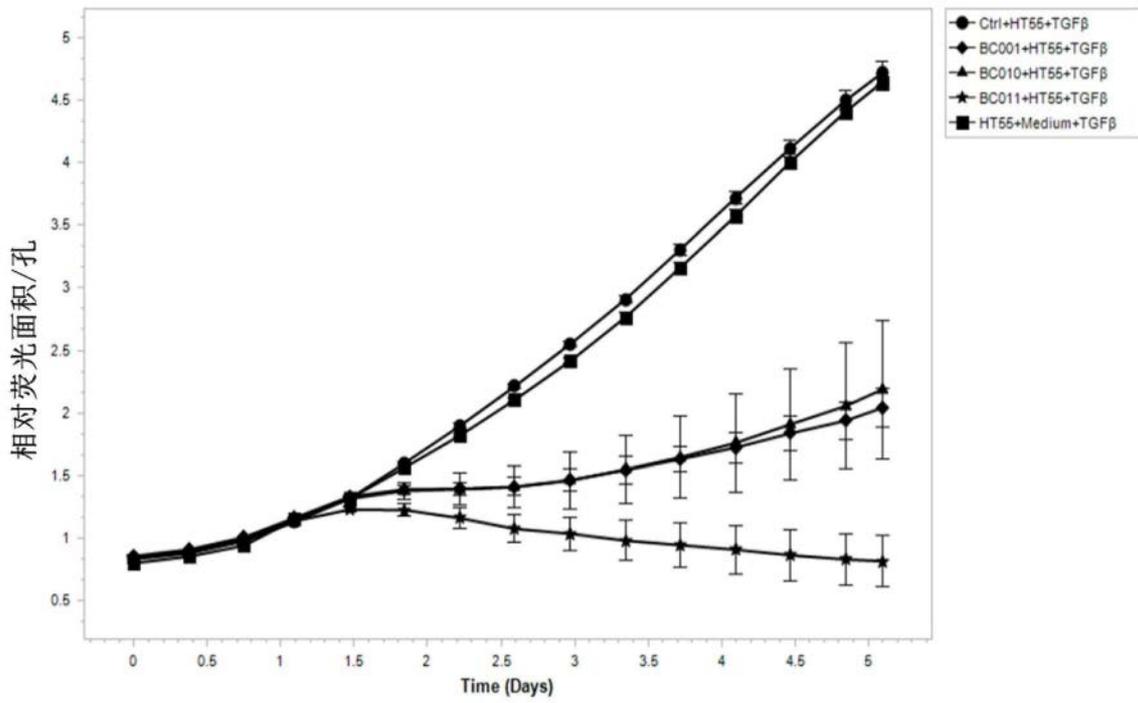


图14

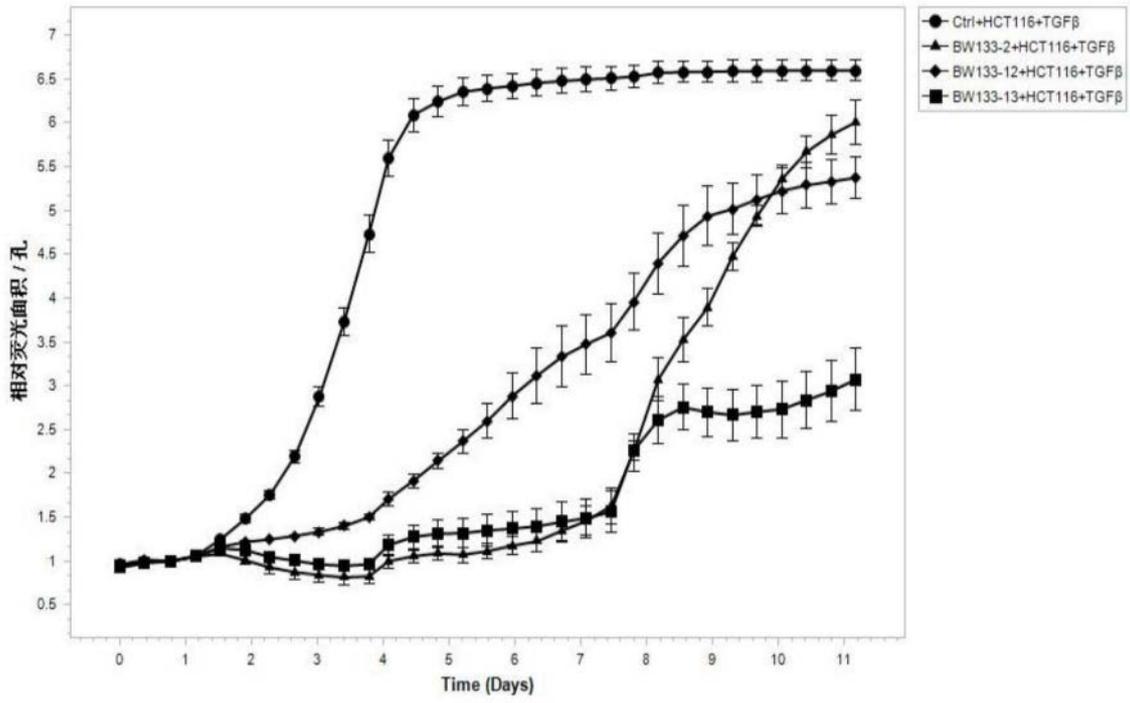


图15

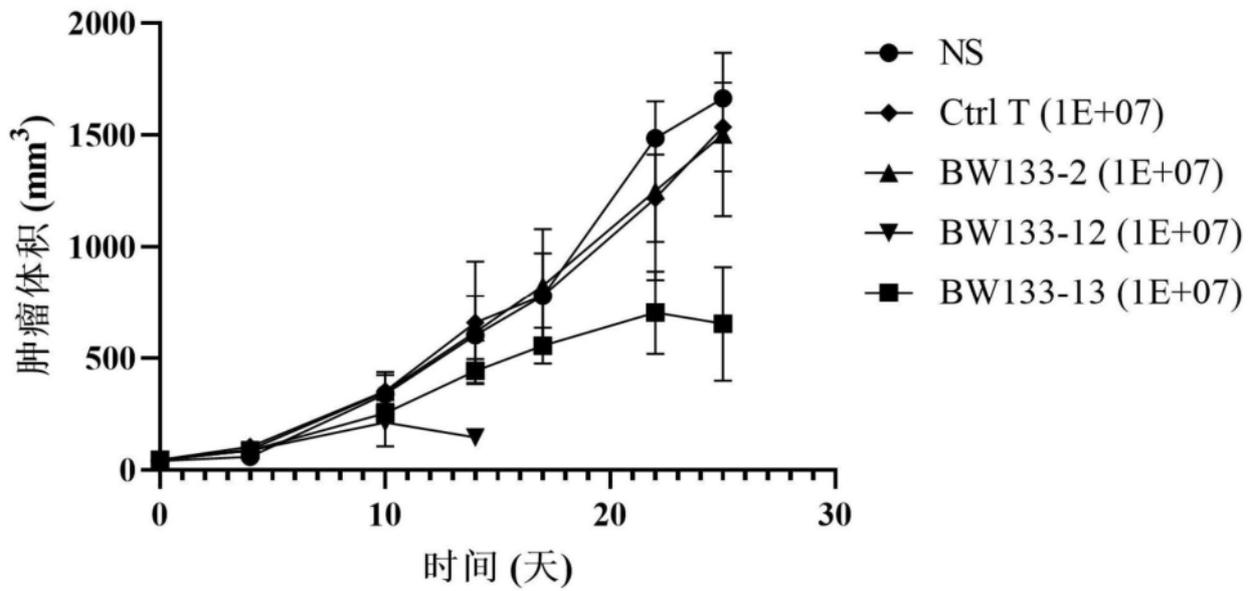


图16

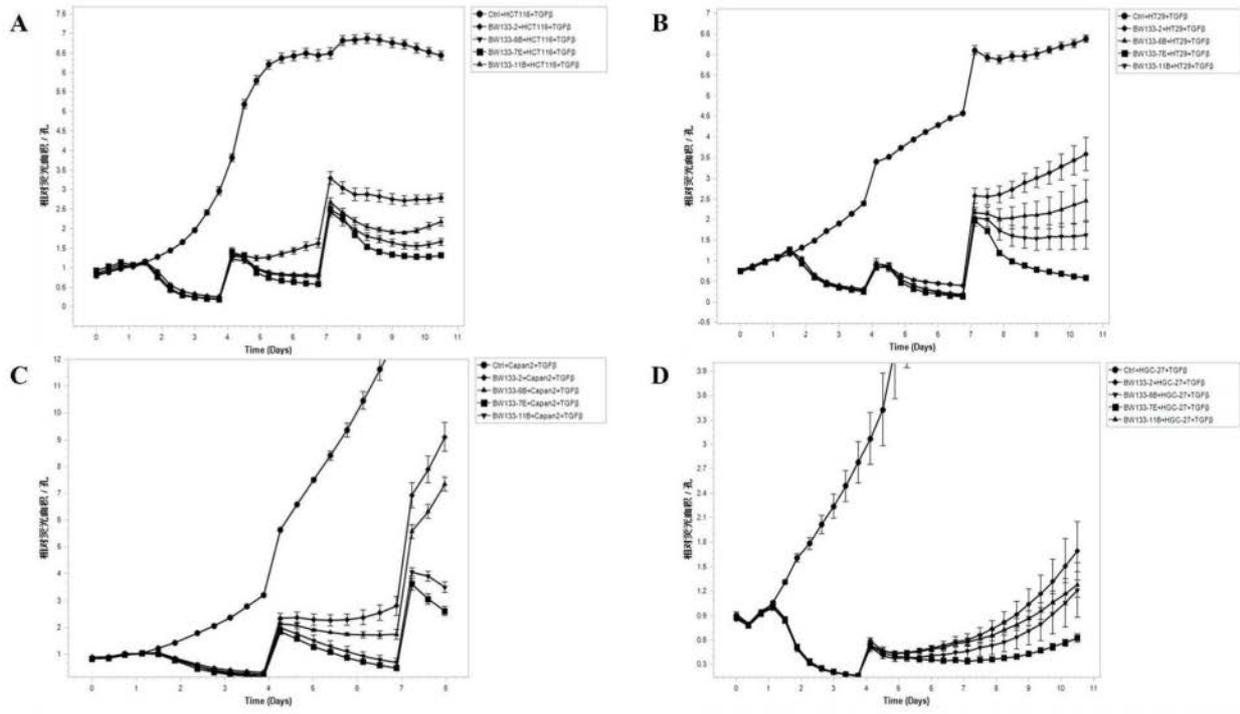


图17

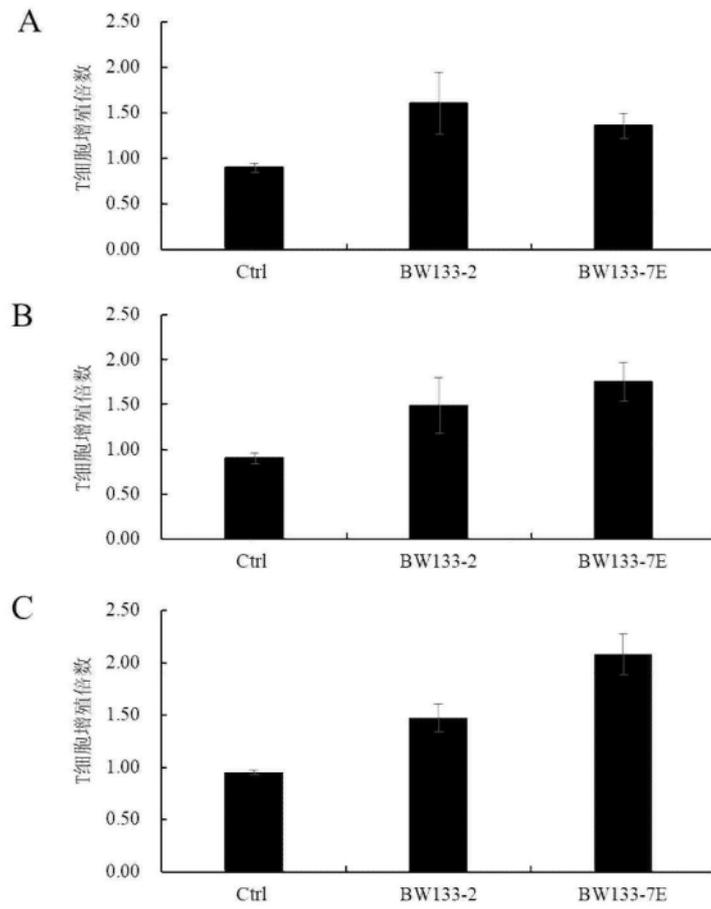


图18